

FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**Detección de Anticuerpos Específicos Contra Trichinella Mediante
los ensayos de ELISA e Inmunotransferencia en Sueros de los
Cándidos y Félidos Silvestres Albergados en el Zoológico
de Chapultepec**

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MIGUEL ALFONSO PEÑA RIVERON

ASESORES: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

DRA. GUADALUPE ORTEGA-PIERRES

DRA. LILIAN YEPEZ MULIA

M.V.Z. FERNANDO GUAL SILL

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1995

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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Detección de anticuerpos específicos contra Trichinella mediante los ensayos de elisa e
inmunotransferencia en sueros de los cánidos y félidos silvestres albernados en el Zoológico
de Chapultepec".

que presenta el pasante: Miguel Alfonso Peña Rivera
con número de cuenta: 833884-B para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de marzo de 199 5

PRESIDENTE Dra. Carila Arriaga Díaz
VOCAL MZ. Pablo Martínez Labat
SECRETARIO MZ. José A. Licea Vega
PRIMER SUPLENTE MZ. Gloria Ortiz Gasca
SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Fernando Alba Hurtado

Carila Arriaga Díaz
Pablo Martínez Labat
José Antonio Licea
Gloria Ortiz Gasca
Fernando Alba Hurtado

AGRADECIMIENTO

A MI PADRE:

Alfonso Peña Cervantes por guiarme por el mejor camino y a pesar de que hubo muchas veces que no estuvimos juntos yo se que siempre estuviste y estarás conmigo, por toda tu confianza y sacrificio para darme una carrera que hoy se culmina y que se ha logrado gracias a ti.

A MI MADRE:

Pilar Riveron de Peña por todo el amor y apoyo que me has dado, por haber logrado sacarnos adelante a mi y a mis hermanas con todas esas fuerzas que tienes para haber logrado en mi lo que ahora culmina, una carrera que en mayor parte es gracias a ti.

A MIS HERMANAS:

Angélica y Lourdes por el apoyo que siempre me han brindado y la confianza que tienen en mi y que nunca defraudare.

A MI ESPOSA:

Martha por tu gran amor y por tu apoyo durante toda la carrera y mas que nada por unir tu vida a la mia.

A MIS AMIGOS:

Miguel, Teresa, Chucho, Pancho, Nacho, Jorge, Blanca, Ramón, Manuel, Rossina, Elena, Rey David, Lenia, Xochitl, por los momentos tan felices que pasamos durante la carrera y sobre todo por brindarme su amistad.

A MIS ASESORES:

Las doctoras Camila Arriaga, Guadalupe Ortega, Lilián Yépez, y al M.V.Z. Fernando Gual por darme todo su apoyo y facilidades para la realización de este trabajo de tesis.

A todo el personal del CINVESTAV que cooperó para la realización de este trabajo, en especial para Noemí por su gran ayuda en la realización de mis pruebas.

A la C. Marielena Hoyo Bastián por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar en el lugar donde siempre quise estar.

A mis compañeros del Servicio Médico Veterinario del Zoológico de Chapultepec, así como a los Zootecnistas del mismo por su ayuda en la obtención de las muestras para la realización de este trabajo, pero principalmente por su amistad.

A todos los animales que se encuentran albergados en el Zoológico, por darnos la oportunidad la oportunidad de aprender de ellos y así ayudar a su conservación.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Generalidades del parásito	3
Ciclo biológico	7
Cepas y distribución geográfica	10
Formas de transmisión	11
Antecedentes sobre la infección de animales silvestres con <u>Trichinella</u>	15
Aspectos clínicos de la triquinelosis en animales	16
Aspectos clínicos de la triquinelosis en el hombre	18
Respuesta inmune contra <u>Trichinella</u>	20
Métodos de diagnóstico	23
Clasificación taxonómica de las familias <u>Canidae</u> y <u>Felidae</u>	29
Objetivos	34
Material y métodos	35
Obtención de muestras	35
Obtención de la larva muscular de <u>Trichinella</u>	36
Obtención del antígeno	36
ELISA empleando antígeno total	37
ELISA empleando antígeno purificado de superficie/esticosoma o con antígenos de secreciones-excreciones de <u>T. spiralis</u>	38
Inmunotransferencia	38
Resultados	40
Discusión	56
Conclusiones	60
Sugerencias	61
Bibliografía	62

RESUMEN

La infección causada por parásitos del género Trichinella se ha reportado en muchas especies de animales silvestres. Sin embargo no existe mucha información sobre la frecuencia de la triquinelosis en animales de los zoológicos. En el Zoológico de Chapultepec se presentó el caso de una hembra de Oso polar (Ursus maritimus) la cual al realizarle la necropsia presentó una gran cantidad de larvas musculares de Trichinella las que fueron identificadas por el Centro de Referencia para Triquinelosis localizado en Roma, Italia como T. nativa. Asimismo, se reportó que quizás esta infección no fue la causa de la muerte del animal. Sin embargo resulta interesante el poder determinar si el animal adquirió la infección en el lugar de origen o la adquirió en cautiverio a través de la ingestión de carne contaminada con larvas musculares de Trichinella. Una fuente posible puede ser la carne de caballo con la cual se alimentan estos animales. Esto último resulta sugestivo ya que en otros lugares se han reportado brotes de triquinelosis causadas por consumo de carne de caballo infectada con el parásito. Cabe mencionar que las especies de Trichinella involucrados en estos brotes han sido T. nativa, T. britovi y T. spiralis.

Considerando estos aspectos se propuso realizar un estudio serológico para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos a Trichinella en sueros de cánidos y fétidos silvestres albergados en el Zoológico de Chapultepec que son alimentados con carne de caballo. Para ello se emplearon los ensayos de ELISA e inmunoelectrotransferencia previamente estandarizados para detectar la infección de estos animales por Trichinella.

De esta forma, se analizaron sueros de 6 lobos, 7 coyotes, 9 zorras grises, 9 jaguares, 10 leones africanos, 10 tigres de bengala, 1 tigre siberiano, 8 leopardos, 6 panteras negras, 2 linceos rojos, 5 pumas, 1 jaguarundi y 1 ocelote colectados en el Zoológico de Chapultepec, empleando un ensayo de ELISA con antígenos totales de larvas musculares de T. nativa y de T. spiralis así como componentes de excreción/secreción y antígeno purificado de superficie/estocoma de T. spiralis.

Los resultados obtenidos mostraron anticuerpos contra antígeno total de T. nativa y de T. spiralis en un 24% y un 22.6% respectivamente. Así como un 12% y un 14.6% de positividad con antígenos purificados de superficie/estocoma y de los productos de secreción-excreción de T. spiralis respectivamente. Estos datos sugieren que se puede evitar la obtención de reacciones cruzadas con otros parásitos mediante el empleo de antígenos purificados de secreción-excreción y de superficie/estocoma.

Los sueros positivos fueron a su vez analizados por inmunoelectrotransferencia, así como algunas muestras que tuvieron valores de DO bajos en el ELISA. La mayoría de las muestras positivas presentaron un patrón de reconocimiento antigénico característico de animales infectados con el parásito. Así se tiene que de 75 muestras

serológicas 17 resultaron positivas a la prueba de inmunoelectrotransferencia lo que equivale a un 22.66% de positividad. Observándose que no todos los animales positivos en ELISA resultaron positivos por inmunoelectrotransferencia, por lo que se concluye que se requiere de ambas pruebas para determinar la presencia del parásito en los animales.

El grupo de animales que presentó mayor número de positivos fue el de los lobos (83%) seguido por los jaguares (33%), leones (30%), tigres de bengala (30%), coyotes (25%) y zorras grises (11%).

INTRODUCCION

La Triquinelosis es una zoonosis de ocurrencia universal, causada por el nemátodo Trichinella el cual puede infectar a una gran variedad de hospederos, entre ellos al hombre.

GENERALIDADES DEL PARASITO:

Trichinella pertenece al Phylum: Nematoda, Clase: Adenophorea, Orden: Edrollaimarida, Superfamilia: Trichineloidea, Familia: Trichuridae, Subfamilia: Trichurinae, Género: Trichinella. (Quiroz, 1984).

El parásito en estado adulto vive pocas semanas en el intestino delgado del hombre, rata, cerdo, perro, gato y 75 especies de hospederos silvestres y en estado larval se enquistas en el tejido muscular de estos hospederos, donde puede permanecer viable por largo tiempo (Acha, 1986; Gould, 1970; Velázquez, 1986).

Las larvas de Trichinella son parásitos muy pequeños y delgados de color blanco cremoso. Cuando están sexualmente maduras, miden sólo unos milímetros difícilmente visibles a simple vista. Las dimensiones corporales del macho son 1.4 a 2.2 mm X 30 a 40 micrómetros y las hembras 2.2 a 6 mm X 60 a 72 micrómetros, existiendo considerables variaciones según la especie de hospedero.

Se presenta bajo dos formas diferentes, que corresponden a su ciclo biológico y son: Trichinella intestinal sexual y Trichinella muscular asexual (Ver figura 1). El extremo cefálico es adelgazado y lleva un pequeño aguijón perforante. La cutícula en las larvas musculares consta de tres capas gruesas que aparecen anilladas. El aparato digestivo consiste en una abertura bucal, esófago, intestino y abertura de cloaca (Ajenjo, 1980; Borchert, 1975). El esófago que posee una parte anterior corta y musculosa, es un

tubo largo y fino, cuticular que aparece rodeado por unas 50 células muy conspicuas llamadas esticocitos, que tienen gran importancia en la biología del parásito y en la relación hospedero-parásito, ya que al desarrollarse secretan productos inmunogénicos, y quizás incluso estén relacionados con la maduración que les permite resistencia al jugo gástrico y en consecuencia madurar en el nuevo hospedero (Vega y Fernández, 1986).

Los órganos genitales están formados en el macho, por el tubo testicular, conducto deferente y orificio genital. Los testículos son tubulares y llegan desde la última cuarta parte del cuerpo hasta la mitad aproximadamente y desde aquí vuelven hacia atrás y el vaso eferente desemboca con la vesícula seminal en la cloaca, situada en las proximidades del extremo posterior e incluida entre 2 apéndices conoides, esta puede evaginarse en el momento de la cópula. El órgano genital de la hembra es simple, formado por el ovario, el útero, la vagina y la vulva. El ovario radicado en la última quinta parte del cuerpo, se dirige hacia adelante y mediante un corto oviducto pasa al útero, que desemboca ventralmente por detrás de la primera quinta parte del cuerpo, en el transcurso del cual los huevos fecundados (que miden 40 X 30 micrómetros) evolucionan hasta que, al salir por la vulva, están ya en forma de larvas recién nacidas desprovistas de membranas de envoltura y dotadas de un estilete oral, las cuales miden en total 80 a 100 X 6 micrómetros (Ajenjo, 1980).

Cada hembra produce un número variable de larvas según la especie y la cepa del hospedero, su estado inmunológico, fisiológico, nutricional, pero puede considerarse del orden de 100 a 2000 en el transcurso de su vida que se calcula en 4 a 8 semanas (Ajenjo, 1980).

La larva muscular que es la fase tisular de Trichinella, tiene una longitud de 0.1 a 0.5 mm, la parte anterior de su cuerpo es puntiaguda y la posterior es redondeada y hundida (cloaca). Como todos los nemátodos pasa por 4 mudas durante su vida. La primera y a veces la segunda pueden tener lugar en el huevo (Peña, 1988). Las restantes se producen en el hospedero definitivo. Aparentemente un estímulo externo

desencadena una respuesta en el parásito y lleva a la producción de enzimas que inician la etapa de transformación (Borchert, 1975; Zaman, 1984).

Las larvas enquistadas son hialinas; el quiste donde se encuentran, mide 300 a 400 micras de largo por 150 a 200 micras de ancho; se encuentran enrolladas semejando un espiral, tienen una vaina elipsoidal que la cubre, su eje longitudinal es paralelo a las fibras musculares. A ésta vaina elipsoidal se le denomina "célula nodriza". El tiempo de modificación durante el cual la célula estriada normal pierde sus características de célula muscular hasta llegar a ser célula nodriza es de 20 días. El citoplasma de la célula de la célula nodriza está constituido por membranas lisas en espirales, mitocondrias disfuncionales y por 45 a 50 grandes núcleos. Los núcleos empiezan a aumentar de tamaño 5 días después de una infección intramuscular, alcanzando su tamaño máximo en 8 días (Despommier, 1990). Poco tiempo después la célula nodriza desarrolla una capa de colágeno rígida y una red de vasos anastomosados. El complejo circulatorio está constituido por arteriolas y vénulas planas, muchas de las cuales terminan en proyecciones ciegas, los polos de la célula nodriza están compuestos de una capa gruesa de colágeno pero sin vasos asociados (Salazar y Hara, 1986).

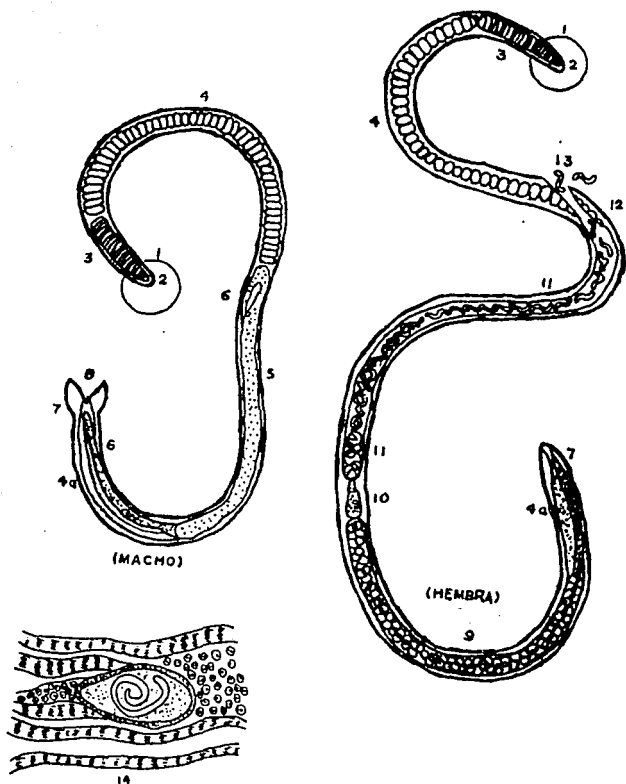


Fig. 1 *Trichinella* intestinal y larva muscular

1.-Agujijón perforante 2.-Boca 3.-Porción cefálica 4.-Estómago glandular o esticoma 4a.-Intestino 5.-Testículo 6.-Vaso eferente 7.-Vesícula seminal de la cloaca 8.-Apéndices conoides o copuladores 9.-Ovarios 10.-Oviducto 11.-Utero 12.-Vagina 13.-Vulva 14.-Larva muscular enquistada (Ajenjo, 1980).

CICLO BIOLÓGICO:

Este se inicia con la ingestión de larvas enquistadas en el tejido muscular del hospedero y una vez localizadas en el estómago de un carnívoro u omnívoro son liberadas gracias a los jugos gástricos; emigran y se alojan entre las vellosidades de la mucosa intestinal y las criptas glandulares del intestino delgado, donde sigue su desarrollo, permaneciendo ahí hasta realizar 4 mudas para alcanzar su estadio adulto en 2 o 3 días. Poco tiempo después de la cópula, las hembras empiezan a depositar larvas nacidas de los huevos depositados en su útero. Los machos mueren y son arrastrados por las heces hacia el exterior, mientras que las hembras viven de 7 a 8 semanas localizadas en la mucosa intestinal.

A los 4 a 7 días postinfección se realiza la postura de cerca de 200 a 1500 larvas, las cuales penetran la pared intestinal con la ayuda de su estilote bucal y entran a los vasos linfáticos y vénulas mesentéricas para llegar, por el conducto torácico o por la vena porta a la vena cava posterior. De allí van al corazón derecho, pulmones, corazón (lado izquierdo) y, por la circulación arterial a todos los órganos y tejidos, en donde pueden permanecer un tiempo limitado. Después entran nuevamente en circulación, abandonan los capilares y se alojan en los músculos estriados, donde finalmente se encapsulan. Las larvas que quedan en otros órganos y tejidos, incluyendo los músculos lisos, mueren al poco tiempo. A partir del quinto día de la infección se pueden encontrar las larvas penetrando el sarcolema de las fibras musculares. Los grupos musculares preferidos son los más activos, sobre todo los pilares diafragmáticos, los maseteros, los linguales, los de la espalda y los lumbares. El hospedero comienza a formar una cápsula alrededor de la larva aproximadamente 2 semanas después de la infestación, la cual queda completa a las 4-5 semanas, tomando la forma de un limón. Desde la penetración a la fibra muscular hasta la encapsulación, la larva sigue creciendo y alcanza sus dimensiones máximas (Imm) a las 4 ó 5 semanas después de la infección.

Las larvas completamente desarrolladas e infectantes se encuentran enrolladas en espiral dentro de la cápsula y están sexualmente diferenciadas en machos o hembras. Todo el ciclo se desarrolla en un solo hospedero; para que pueda iniciarse un nuevo ciclo es necesario que la larva encapsulada dentro del músculo sea ingerida por un nuevo hospedero, ya sea de la misma especie animal o de otra.

La fase intestinal de desarrollo por lo general es corta y varía de 10 días a varias semanas, según la especie del hospedero. Las larvas encapsuladas pueden sobrevivir años en el tejido muscular del hospedero. A medida que pasa el tiempo, la cápsula fibrosa se espesa y se inicia un proceso de calcificación dentro del quiste. Se estima que la larva muscular puede permanecer viva en el hombre de 5 a 10 años. La larva enquistada es muy resistente a factores físicos y químicos. Desde el punto de vista epidemiológico es muy importante su resistencia a la putrefacción, habiéndose encontrado larvas vivas y a menudo infectantes durante por lo menos 4 meses en carnes en estado avanzado de descomposición. Las larvas musculares son resistentes también a la desecación, salazón y ahumado (Acha, 1986; Kovac y Ramos, 1985).

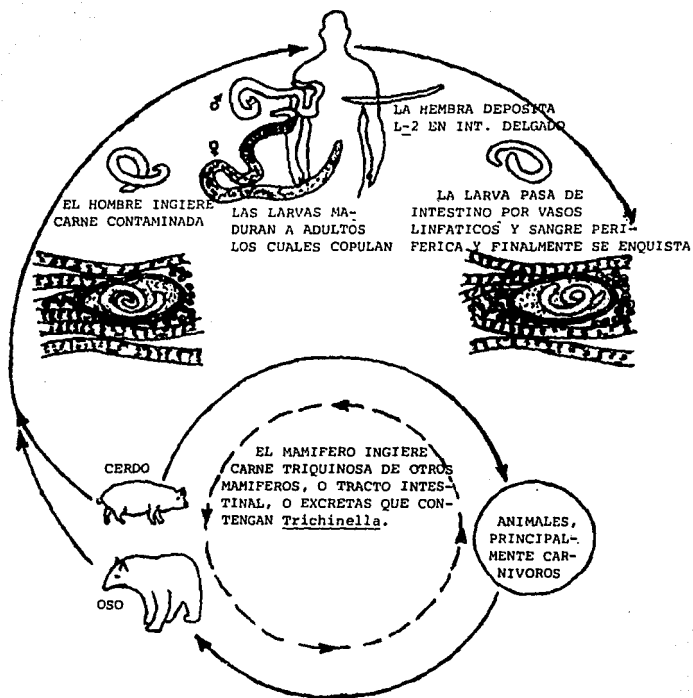


Figura 2 Ciclo biológico (Gould, 1970)

CEPAS Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA:

Los parásitos del género Trichinella son cosmopolitas. Su presencia no ha sido comprobada en Australia, en varios países latinoamericanos, asiáticos y africanos, pero hay que hacer la salvedad de que las investigaciones realizadas se han limitado exclusivamente al ciclo doméstico, especialmente al cerdo, la rata y el hombre. Se debe tener en cuenta que la infección puede existir en animales silvestres sin que se registren casos en el hombre y en los animales sinantrópicos (Acha, 1986).

La compleja taxonomía del nemátodo del género Trichinella está bien documentada por numerosos estudios bioquímicos, biológicos, epidemiológicos, clínicos e inmunológicos. El tradicional criterio morfológico es inadecuado para diferenciar a las especies de este género. La aplicación del criterio bioquímico ha confirmado la heterogeneidad existente (La Rosa y col., 1992; Pozio y col., 1992a). El criterio biológico consiste en estudiar la capacidad reproductiva del parásito, la resistencia de la larva muscular a bajas temperaturas, virulencia en el hospedero, la distribución intestinal del adulto y la duración de la fase intestinal, la producción de larvas in vitro a partir de las hembras y la sensibilidad del parásito a el tratamiento (Pozio y col., 1992b).

En el siguiente cuadro se da la taxonomía, distribución y hospederos de siete géneros de *Trichinella* aislados en base a los criterios anteriores:

CLASIFICACION	DISTRIBUCION	HOSPEDERO	INFEC. AL HOMBRE
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita	Cerdo doméstico y carnívoros silvestres	Si
<i>T. nativa</i>	Reg. ártica y subártica	Mamíferos silvestres	Si
<i>T. nativa</i> tipo 2	Reg. neártica	Animales silvestres	No reportado
<i>T. nativa</i> tipo 3	Reg. neártica	Animales silvestres	No reportado
<i>T. britovi</i>	SO de la reg. paleártica	Animales silvestres incluyendo animales domésticos en contacto con el ciclo selvático	Si
<i>T. nelsoni</i>	Reg. etiópica	Animales silvestres	Si
<i>T. pseudospiralis</i>	Desconocido	Aves y mamif.	No reportado

Tomado de Pozio y col. 1992a.

FORMAS DE TRANSMISION:

En la transmisión de la triquinosis (fig. 3) pueden presentarse ciclos infectantes selvático y sinantrópico-zoonótico (doméstico) independientes.

a) **CICLO SELVATICO:** Desde el punto de vista biológico es el primero, variando mucho de una región geográfica a otra, puede ser complejo como en el Ártico, donde se encuentran parasitados hasta los mamíferos marinos o en el trópico donde existen variados medios de transmisión entre necrófagos, presas y predadores (Ruiz, 1992). En este ciclo intervienen carnívoros de vida libre tales como zorros, chacales, jabalíes, osos negros, morsas, etc., y estos animales mantienen la transmisión. La triquinosis humana asociada con el consumo de carne de oso cada vez es más común (Soulsby, 1988) y ha sido considerado como un intercambio entre el predador y la

presa. Los Carnívoros devoran animales infectados, estas presas son animales debilitados por el parasitismo muscular y por lo tanto son más fácilmente capturados y esto puede asegurar la propagación del parásito (Leiby y col., 1988). Otra forma de transmisión es mediante el consumo de carroña de animales infectados.

Por otro lado, al entrar en putrefacción los portadores de Trichinella, puede producirse la diseminación de quistes calcificados pero todavía infectantes. Esta diseminación de quistes puede verse favorecida por la precipitación pluvial, con la subsecuente contaminación del agua y de alimentos de tal manera que también pueden infectarse animales herbívoros al ingerir forrajes o aguas infectadas, además de que con la humedad ambiental se da la proliferación de insectos necrófagos que contribuyen a la dispersión del agente (Borchert, 1975; Ramirez, 1985).

En las aves la triquinosis no puede producirse debido a que la Trichinella no puede reproducirse, y los embriones son arrojados con los excrementos (Saiz, 1976). Sin embargo, se ha observado que los huevos de algunas aves marinas como la gaviota contaminados con sus heces son fuentes de infección para los osos polares. Algunas aves depredadoras como la lechuza pueden infectarse también (Quiroz, 1984).

El ciclo selvático no está restringido solo a la fauna silvestre ya que el hombre puede infectarse por el consumo de carne de animales salvajes infectados; así, los esquimales se han infectado por consumir carne de oso polar y morsa (Campbell, 1983). En la región del Ártico la carne de varios mamíferos tradicionalmente ha formado una parte importante de la dieta de varios indígenas (Smith, 1987).

b) CICLO DOMESTICO: El ciclo sinantrópico-zoonótico tiene como eje al cerdo e incluye a otros animales, tales como el perro, el gato y la rata. El parásito se transmite de cerdo a cerdo, principalmente por la ingestión de desechos que contienen fibras musculares de origen porcino. Por esto último la incidencia en el cerdo es alta cuando son alimentados con residuos de cocina, de restaurantes y rastros, o cuando se mantienen en los basureros de las poblaciones ya que la larva enquistada es muy

resistente a la putrefacción. Otra fuente de infección puede ser la carne de cadáveres de animales infectados, entre ellos las ratas muertas, que se pueden encontrar en los basureros.

Los perros, gatos y ratas se infestan de las mismas fuentes que los cerdos y quedan incluidos en el ciclo, pero su papel epidemiológico es secundario. En un estudio hecho por Cowen y col. (1990) se reportó que en granjas de cerdos donde hay acceso de gatos así como de algunos mamíferos silvestres fue más alta la infección de los cerdos.

El hombre está involucrado en el ciclo que él mismo crea al alimentar los cerdos con residuos crudos de carne de otros cerdos parasitados. Sin embargo, el hombre es biológicamente un hospedero accidental, en el que el parásito no encuentra salida para continuar el ciclo. La infección humana se produce por el consumo de carne de cerdo y sobre todo de productos de origen porcino crudos o insuficientemente tratados por el calor o por otros medios (Acha, 1986).

Por otro lado se han asociado brotes de triquinosis con caballos. Algunos parecen deberse a la contaminación de carne de caballo con cerdo, pero además, los caballos son susceptibles a la infección con *Trichinella*, y pueden infectarse si los alimentos comerciales contienen residuos de carne infectada (Soulsby, 1988). En el año de 1985 se presentaron 2 epidemias en Francia con más de 1500 individuos involucrados y se debieron al consumo de carne de caballo infectada con *T. spiralis* y *T. nativa* (Ancelle y col., 1988).

Ambos ciclos no son completamente independientes puesto que pueden mezclarse entre sí, como sucede en algunos lugares donde el hombre alimenta a sus perros con carne de animales silvestres infectados; también las ratas pueden mantener la infección mediante el canibalismo y pueden mantener un intercambio entre los dos ciclos (Campbell, 1983).

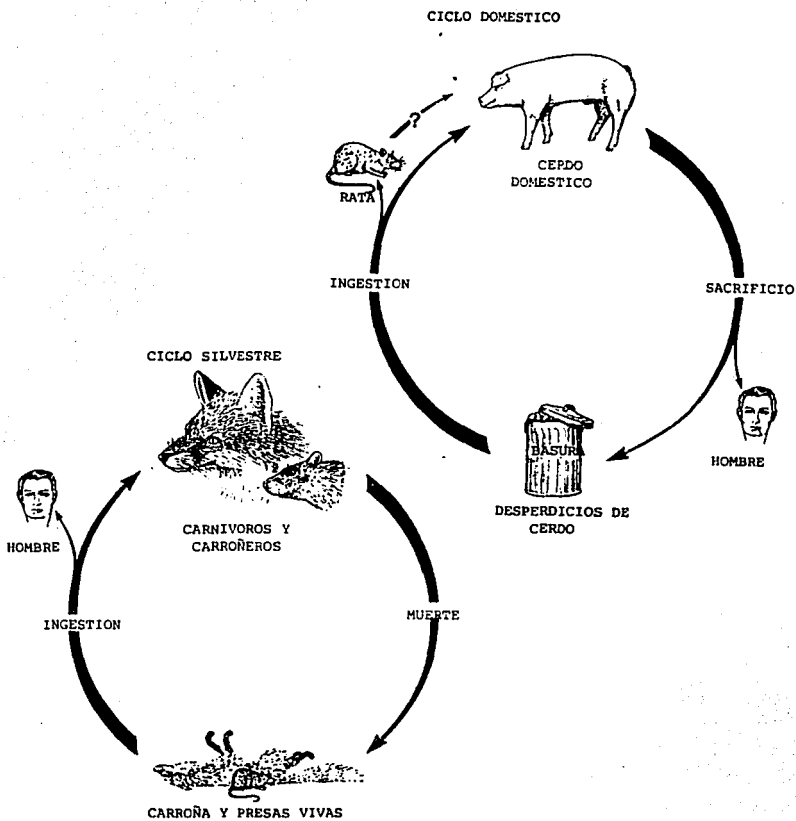


Figura 3.- Formas de transmisión (Campbell, 1983)

ANTECEDENTES SOBRE LA INFECCION DE ANIMALES SILVESTRES CON Trichinella:

Se tienen reportes frecuentes sobre infecciones naturales por Trichinella en mamíferos marinos como morsas y ballenas (Merck, 1988).

En relación con la infección en animales silvestres existen varios reportes. Así en la ExURSS entre los años 1979 y 1983 se detectaron niveles altos de infección de Trichinella spiralis, en lobos, oso café, mapaches, zorra roja, lince y cerdos silvestres. (Bessonov, 1984).

Smith y Snowdon (1988) mediante la prueba de digestión artificial con pepsina, detectaron zorros del Ártico, zorros rojos, lobos grises, coyotes, mapaches, lince canadienses, lince rojo y perros que estaban infectados con la forma silvestre de Trichinella en las regiones del Oeste de Canadá entre los años de 1980 y 1986.

Asimismo, Brglez en 1985 y 1986, mediante el método de digestión artificial, encontró infectadas especies carnívoras incluyendo lobos, osos café, zorras rojas, gatos silvestres y varios mustélidos y otros animales de diferentes regiones de Yugoslavia (Brglez, 1988).

En la República Federal de Alemania, entre los años 1985 y 1987 se reportaron casos de triquinosis en zorras rojas, cerdo salvaje y tejón común (Wagner y Frank, 1988).

En Alaska y Canadá se ha detectado triquinosis en osos polares, ballena blanca, zorra del Ártico, lobos, y zorras rojas; asimismo el perro doméstico parece ser un hospedero sinantrópico de Trichinella spiralis a altas latitudes (Campbell, 1983).

En otro estudio realizado en el Distrito de Columbia Británica, Canadá, en 1972 y 1973 se encontraron infectados con el parásito a osos negros, osos grizzly, martas, pumas, lince rojo, mofetas rayadas, glotones, musarañas, coyotes y lince canadienses (Campbell, 1983).

En Groenlandia, la infección con Trichinella ha sido determinada en osos polares, perros domésticos, focas barbudas, zorras del ártico y morsas (Campbell, 1983). En Estados Unidos se ha reportado triquinosis en osos negros, osos grizzly, pumas, linceos rojos, mofetas rayadas, tejones americanos, minks, zorras rojas, zorras gris, zarigüeyas, mapaches, castores y buhos (Campbell, 1983). Y en Argentina se ha determinado la presencia del parásito en zorras y armadillos (Campbell, 1983).

También en África se han presentado casos de triquinosis en leopardos, hienas, chacales, leones, cerval, licaones y facoceros (Campbell, 1983).

Más recientemente se ha reportado la infección con Trichinella de zorras, cerdos silvestres y ratas en Holanda (Franchimont y col., 1994), osos polares en Groenlandia (Henriksen y col., 1994), así como lobos, zorras rojas y cerdos silvestres en diferentes regiones de Italia (Rossi y Balbo, 1994; Scaramozzino y col., 1994; Stancampianoy col., 1994).

ASPECTOS CLINICOS DE LA TRIQUINOSIS EN ANIMALES:

La triquinosis en los animales raramente se diagnostica durante la vida del animal. La severidad de la enfermedad por lo regular se relaciona con el número de larvas ingeridas, aunque las reacciones clínicas que produce la triquinosis, en una infestación moderada o masiva, según algunos autores, pueden dividirse en tres fases clínicas:

a) INTESTINAL: La fase intestinal que se asocia con la maduración del parásito adulto empieza a partir de las 24 horas de su infección y continúa durante la primera semana, como consecuencia se da una gastroenteritis inespecífica que puede comprender anorexia, diarrea, fiebre ligera, signos de dolor abdominal leve, náuseas y vómito. La diarrea viene acompañada de acúmulos de moco y progresa durante 2 días a una consistencia líquida. El vómito está constituido de espuma y un fluido amarillo claro

(Rice y col., 1990). Experimentalmente se pudo producir una infección letal en 10 a 20 días, con una dosis de 100.000 larvas (Acha, 1986).

En animales muertos en la fase intestinal presentan descamación de la mucosa duodenal aunado a un incremento en células mononucleares (linfocitos, eosinófilos y neutrófilos) en la lámina propia. En la región yeyunal se observa un incremento en el número de células calciformes en áreas donde la descamación aún no ha comenzado ocasionando una enteritis catarral descamativa. Se puede presentar un proceso granulomatoso constituido por un centro de eosinófilos rodeado por un grupo de linfocitos e histiocitos extendiéndose hasta la lámina propia sobre un lado y el interior de la túnica muscular (Reina y col., 1989).

En el perro la hipoglucemia producida por Trichinella es muy evidente y puede ser atribuida a tres factores; la reducida capacidad de absorción del intestino debido a las lesiones (enteritis catarral y descamativa) que se presentan, el alto consumo de glucosa por el parásito o los cambios histopatológicos en el hígado (degeneración glicogénica) (Reina y col., 1989).

b) MUSCULAR: La fase clínica que se asocia con el establecimiento de la larva muscular empieza a la semana de iniciada la infección y continúa durante varias semanas. Produce un cuadro clínico más intenso caracterizado por eosinofilia, anorexia, disnea, edema periorbital, malestar, laringitis y pelaje encrespado.

La miositis causada por la invasión parasitaria produce endurecimiento, inflamación y dolor muscular. Es más notorio cuando los músculos involucrados son los del movimiento como los respiratorios, los maseteros y los de la deglución.

Se hace evidente la dificultad para levantarse y moverse puede presentarse pérdida o retraso en el peso, incluso en las infestaciones no clínicas, generalmente después de 3 o 4 semanas de la infección (Ruiz, 1992).

Histológicamente se observan lesiones de miositis eosinofílica focal (Smith y col., 1991).

La mortalidad se presenta por lo general en la fase muscular.

c) CONVALESCENCIA: La fase de convalecencia comunmente empieza a las 6 u 8 semanas postinfección, con la mayoría de los signos y síntomas en receso. Sin embargo, la rigidez muscular puede persistir, así como transtornos neurológicos, debilidad miocárdica, nefritis o transtornos pulmonares, y en los casos graves pueden aparecer otros desórdenes relacionados con la triquinelosis.

Las diversas manifestaciones clínicas hacen difícil el diagnóstico diferencial. La enfermedad puede diagnosticarse como miositis, artritis, tuberculosis, brucelosis, infecciones pulmonares, salmonelosis, encefalitis y meningitis (Libby, 1981; Merck, 1988).

Las aves son inmunes a la infección, pero los estados de debilidad y en la edad juvenil pueden quebrantar la inmunidad, de modo que el parásito puede llegar a la madurez sexual, aunque la infestación no persiste (Borchert, 1975).

ASPECTOS CLINICOS DE LA TRIQUINELOSIS EN EL HOMBRE:

La infección por Trichinella spiralis en el humano generalmente es asintomática y puede ser evaluada solo por estudios seroepidemiológicos o por exámenes post-mortem encontrándose larvas enquistadas en tejidos musculares. La razón por la que es más común la infección asintomática es el resultado de la dilución de las larvas durante la industrialización de la carne. Por otro lado, las infecciones adquiridas por familias o grupos de cazadores, en el mayor de los casos, muestran ser sintomáticas ya que el número de larvas infectantes usualmente es más alto en estos casos (Velázquez, 1986).

En el hombre se considera que la dosis letal es de 80.000 larvas infectivas (Velázquez, 1986). En los brotes epidémicos la mortalidad varía de 0 a 35%, pero en general es por debajo del 1% (Acha, 1986).

La Triquinosis clínica ha sido tradicionalmente dividida dentro de un estado intestinal, un estado de invasión muscular y un estado de convalecencia. Los síntomas y signos serán considerados de la siguiente forma:

a) SINDROME ABDOMINAL: Es lo primero en aparecer, consiste principalmente en dolor abdominal y diarrea, este síndrome está frecuentemente relacionado con la intensidad de la infección y se debe a la reacción inflamatoria de la mucosa del intestino delgado por el parasitismo

b) SINDROME GENERAL: Consiste en fiebre, mialgia y malestar. se presenta al final del periodo de incubación, la fiebre puede no ser mayor a 38° C en la mayoría de los casos pero en casos severos excede a los 40° C. La mialgia usualmente ocurre al mismo tiempo o un poco después. El malestar se presenta más en casos moderados o severos y depende mucho de la reacción individual del paciente, el malestar es debido a la fiebre, el marcado agotamiento muscular y la enfermedad generalizada.

c) SIGNOS DE VASCULITIS ALERGICA: Se presenta tanto en la infección moderada como en la severa. Consisten en: salida del fluido vascular al compartimiento intersticial observándose edema periorbital y hemorragias, las cuales se observan en ambos ojos en la conjuntiva bulbar entre las pestañas, siendo más intensas en el ángulo medial del ojo.

d) SIGNOS Y SINTOMAS ASOCIADOS CON EL TEJIDO MUSCULAR: El dolor es referido a los músculos más frecuentemente usados. El paciente inmoviliza su cuerpo lo mas que le sea posible, respira superficialmente y se siente más confortable colocando sus codos, cadera y rodillas flexionados.

e) SIGNOS METABOLICOS: Pueden ser hipalbuminemia, hipocalemia, hipoglicemia, cambios en la actividad de varias enzimas y corticosteroides examinados en el suero sanguíneo.

f)COMPLICACIONES DE LA TRIQUINELOSIS: Puede provocar severas complicaciones por migraciones ectópicas de la larva, como en el caso de manifestaciones oculares y cerebrales o por una reacción de hipersensibilidad del organismo como en el caso de manifestaciones cardíacas y pulmonares.

g)PATOLOGIA EN PRUEBAS DE LABORATORIO: De los resultados de laboratorio lo más comúnmente encontrado es la eosinofilia tanto absoluta como relativa, que debe ser valorada sólo con un síntoma indicativo pues también se presenta en otras parasitosis y afecciones de origen alérgico; hay además leucocitosis, niveles altos de Creatinina e hipokalemia (Campbell, 1983).

RESPUESTA INMUNE CONTRA Trichinella:

En animales infectados se ha observado una producción de diferentes clases de anticuerpos contra los distintos estadios del parásito, así como en contra de distintos antígenos del organismo. De esta manera, se han reportado inmunoglobulinas de la subclase IgG1 e IgG2 que reaccionan principalmente con antígenos de células del esticosa y cutícula; y anticuerpos de la clase IgA e IgM presentan reactividad con la membrana del parásito.

La expulsión rápida de adultos constituye el principal mecanismo de defensa en contra de la infección por T. spiralis. Los estadios de preadulto y larva muscular son más eficientes que el estadio del adulto en estimular la expulsión rápida del parásito. Por otro lado, se cree que este proceso es el resultado de un proceso inflamatorio inespecífico en el intestino de los animales infectados inducido por células activadas por antígenos del estadio preadulto así como antígenos provenientes de la larva muscular. Del mismo modo las células T responden a ciertos componentes de la larva muscular y liberan linfocinas y pueden transferir una mastocitosis intestinal, eosinofilia y la expulsión acelerada de los parásitos en el intestino.

Algunos mecanismos de defensa del hospedero se dirigen a la superficie de la larva recién nacida, este estadio es el blanco del efecto citotóxico mediado por eosinófilos, dependiente de anticuerpos.

Con esto se hace evidente que la inducción de la respuesta inmune protectora es específica de cada estadio, por lo que se sugiere, que debido a esta especificidad los componentes de superficie del parásito estén involucrados en la inducción protectora (Yepez, 1991).

A este respecto, algunos estudios se han realizado con el objeto de caracterizar bioquímicamente los componentes de superficie de los diferentes estadios de desarrollo de la Trichinella, demostrando que el patrón de proteínas de superficie de cada estadio está restringido en número, además de ser específicas de estadio. De tal manera que los anticuerpos producidos en infestaciones con el parásito reconocen los antígenos de superficie de un estadio, pero no los de otros estadios. Además, la presencia de otros anticuerpos específicos contra cada estadio son relacionados a la aparición de adherencia de eosinófilos con la superficie del parásito, considerándose que estos anticuerpos mediaban la citotoxicidad de los eosinófilos.

También se ha demostrado que los niveles de resistencia a infecciones por Trichinella está influenciada por genes del complejo principal de histocompatibilidad.

En la actualidad, se ha tenido un avance considerable en cuanto a la caracterización bioquímica de los antígenos de superficie y los productos de secreción-excreción del parásito, gracias a la producción de anticuerpos monoclonales contra los diferentes estadios del parásito, esto ha facilitado también el estudio de su participación en la inducción de protección contra la infección por Trichinella.

De esta forma, un anticuerpo monoclonal (NIM-M1) obtenido por Ortega-Pierras y col. (1990), precipita los 4 antígenos de superficie de la larva muscular con pesos moleculares de 47, 55, 90 y 105 Kd. Permitiendo sugerir que estos 4 antígenos de superficie se originan de un mismo gen y que su producto podría incorporarse a la

superficie del parásito. Además, este anticuerpo (NIM-M1) también reconoce el esticosoma del parásito el cual es el órgano secretor de éste. Mediante cromatografía de afinidad empleando el NIM-M1 ha sido posible purificar los componentes de superficie de la larva muscular del parásito (Ortega-Pierres y col., 1989). Estos antígenos purificados participan en la inducción de inmunidad protectora contra la infección por Trichinella.

Al estudiar el patrón de reconocimiento antigénico por sueros de ratones infectados con T. spiralis se encontró que los componentes principalmente reconocidos son los mismos que reaccionan y son purificados por el anticuerpo monoclonal (NIM-M1) (Ortega-Pierres y col., 1989).

En cuanto a los sueros de humanos infectados por Trichinella estos reconocen un patrón de antígenos parasitarios similar al reconocido por ratones. La respuesta humoral en humanos está dirigida principalmente contra componentes de superficie, aunque también se reconocen productos de secreción-excreción de larva muscular (Salinas y col., 1994).

Por otro lado, los antígenos principalmente reconocidos por sueros de cerdos infectados experimentalmente con T. spiralis fueron aquellos de superficie con pesos moleculares similares a los purificados con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (Arriaga y col., 1989). El mismo patrón se observó en cerdos de traspatio en los que se encontraron larvas de Trichinella por digestión artificial (Arriaga y col., 1991).

En cuanto a los productos de secreción-excreción de la larva muscular de Trichinella, estos son producidos en el esticosoma que ocupa la parte media anterior del cuerpo del parásito y consisten aproximadamente en 20 antígenos. El esticosoma está formado por una hilera de 45 a 55 esticocitos y en ellos se producen los antígenos. Los esticocitos secretan su contenido como productos solubles en el hospedero durante las primeras 30 horas de la fase enteral de la infección (Yepez, 1991). Se han demostrado que 2 glucoproteínas de secreción-excreción (Ts 49 y Ts 53) de la larva

muscular son capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra la infección por Trichinella, expulsando aceleradamente a los organismos adultos y reduciendo la fecundidad de la hembra (Gamble y Graham, 1984b). Por otro lado, componentes de secreción-excreción con pesos moleculares de 48 y 50-55 Kd confieren protección significativa contra la infección por Trichinella en ratones (81% y 59% respectivamente). La molécula de 48 Kd fue localizada en los esticocitos y en la superficie larvaria y la de 50-55 Kd se encontró en los esticocitos y solo eventualmente en la cutícula del parásito (Despoinnier, 1990). Por lo anterior, se hace evidente que tanto los antígenos de superficie como los productos de secreción excreción de la larva muscular de T. spiralis participan de manera importante en la inducción de mecanismos de protección en contra de las infecciones con este parásito. Quedando por determinar la relación que existe entre ambos componentes ya que epítopos presentes en los antígenos de superficie de la larva muscular también lo están en el esticosoma (Yepez, 1991).

METODOS DE DIAGNOSTICO:

El diagnóstico clínico de la triquinelosis en animales vivos, es difícil, ya que se confunde con variedad de enfermedades y en caso de infecciones subclínicas los animales no muestran síntomas. Sin embargo existen diversas pruebas que nos ayudan a diagnosticarla, las pruebas o métodos que se han utilizado son las siguientes:

A) COPROPARASITOSCOPICO.- El examen de las heces, es recomendable realizarlo en los primeros 10 días post-infección debido a que durante estos días son expulsados gran cantidad de parásitos en su estado larvario y adulto (Adame, 1981). Este examen tiene la desventaja de que la demostración en la materia fecal es problemática e impráctica, además en el campo no se sabe cuando se infectan los animales.

B) INTRADERMOREACCION.- Es la más práctica que pudiera utilizarse tanto en las operaciones de rastro como en estudios epidemiológicos (Libby, 1981).

Esta prueba revela si el animal sufre o ha sufrido la infección por Trichinella mediante la reacción inflamatoria de toxina o antígeno. Sin embargo, esta técnica se considera insuficientemente sensible e inespecífica, debido a que otros nemátodos como Ascaris, pueden dar reacciones cruzadas con los antígenos de Trichinella (Quiroz, 1984; Herrera, 1985).

C) VALORACION DEL AUMENTO DE LOS POLIMORFONUCLEARES EOSINOFILOS.- Es de las pruebas más utilizadas ya que en esta infección se hace evidente la eosinofilia, pero esta solo debe tomarse como síndrome indicativo, ya que en otras parasitosis y reacciones alérgicas también se da un incremento de eosinofilia en sangre circulante (Saiz, 1976). Sin embargo, generalmente la demostración de eosinófilos en sangre periférica en los cerdos pasa inadvertida, ya que no se sabe cuando se inicia la infestación en el campo (Kasacos y col., 1986).

D) BIOPSIA MUSCULAR.- A las 3 semanas se pueden diagnosticar las larvas en los fragmentos de musculo recogidos mediante punción de prueba, las muestras pueden estudiarse directamente al microscopio o por digestión artificial o técnicas histológicas. La biopsia en lengua es rápida y fácil, pero dolorosa. Este sitio de punción es el más óptimo, ya que es accesible, es una de las partes más parasitadas y contiene lizosimas que naturalmente es antibacteriana eliminando infecciones secundarias además de que la lengua sana muy rápidamente. Una desventaja, podría ser que solamente detecte infecciones mayores o igual a 2 larvas por gramo; pero se puede aumentar la sensibilidad del procedimiento obteniendo 2 muestras por animal, o utilizando conjuntamente el ELISA, u otros métodos (Kasacos y col., 1986).

E) PRUEBAS SEROLOGICAS.- Entre las pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la triquinosis destacan:

1.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI): Util para la detección de anticuerpos contra Trichinella presentes en pequeñas cantidades al realizar una serie de diluciones, manteniendo una cantidad constante estandarizada de eritrocitos sensibilizados con el antígeno específico. Detecta anticuerpos circulantes 6 a 15 días después de la infección (Peña y col., 1988).

2.- CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF): Se utiliza para la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos presentes en suero. Es una prueba de precipitación que combina las técnicas de difusión en gel y la separación electroforética (Medina, 1977).

3.- ANTICUERPOS INDIRECTOS FLUORESCENTES (IFA): Esta técnica aunque es específica es costosa en tiempo y economía. La reacción antígeno anticuerpo se efectúa en discos absorbentes, evaluándose la reacción con el fluorómetro. En animales con más de 6 a 9 larvas de Trichinella por gramo se lograron reacciones positivas en un 81.9% de los sueros recogidos 3 semanas post-infección y sacrificio 26 a 38 semanas post-infección, esto indica que se requiere aumentar su eficiencia antes de que se pueda utilizar en pruebas de rutina (Arriaga y col., 1992; Libby, 1981).

4.- INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA (ICD): Tiene una sensibilidad del 100% en animales de laboratorio, es una técnica serológica sencilla de efectuar, barata y fácil de llevar a cabo. La prueba comienza a detectar anticuerpos antitrichinella en conejos a partir de la cuarta y quinta semana post-infección. Los resultados que se han obtenido indican que la prueba da buenos resultados utilizando antígeno somático crudo de Trichinella en roedores infectados con el parásito (Peña y col., 1988).

Entre otras pruebas serológicas que se han utilizado se pueden citar la prueba de carbón (CC), la prueba de fijación de complemento, floculación con bentonita, aglutinación con látex-viscosa (Haralabidis y col., 1989), anillo de precipitación, floculación de Suessenguth-Kline, etc.

F) ENSAYOS INMUNOENZIMATICOS.- Los ensayos inmunoenzimáticos, como el ELISA, han desplazado a muchas de las pruebas descritas anteriormente, debido principalmente a su alta sensibilidad y facilidad de ejecución que permite examinar gran número de muestras en corto tiempo (Arriaga y col., 1992).

1.- PRUEBA DE ELISA: En estos ensayos el antígeno o el anticuerpo primero se fija a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que está marcado con una enzima (conjugado) y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato (Tizard, 1985).

Los primeros en utilizar la prueba de ELISA para el diagnóstico de triquinosis fueron Ruitenber y col. (1974), quienes demostraron que esta prueba es más sensible que la inmunofluorescencia y la detección directa del parásito (Ruitenber y col., 1974; Van Knapen y col., 1980). Sin embargo uno de los problemas que más se presentan en esta prueba es la gran cantidad de falsos positivos (Ruitenber y col., 1976) lo cual se atribuye a la utilización de antígenos crudos ya que se presentan reacciones cruzadas con otros parásitos comunes como *Trichuris* sp. o *Ascaris* sp. entre otros (Chan y Ronald, 1990; Gamble y Graham, 1984b).

La especificidad de la prueba de ELISA se ha aumentado utilizando antígenos purificados como los de superficie/esticosoma (Arriaga y col., 1989; Seawright y col., 1983) y los antígenos de excreciones y secreciones (Gamble y col., 1983) los cuales han permitido la detección específica de animales con cargas parasitarias bajas. Estos antígenos han sido evaluados en el campo mostrando buena sensibilidad y especificidad, (Arriaga y col., 1991; Cowen y col., 1990; Murrell y col., 1986; Smith y Snowdon, 1989), puesto que permiten la detección únicamente de *Trichinella*, evitando así reacción

cruzada con otros parásitos. También se pueden disminuir los falsos positivos realizando una prueba indirecta de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales contra Trichinella los cuales van a competir con los anticuerpos que se encuentren en el suero problema (Gamble y Graham, 1984a).

2.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT):

Actualmente se ha desarrollado la técnica de inmunoelectrotransferencia o Western blot, en la cual se separan por electroforesis los componentes del extracto total de la larva muscular del parásito y se transfieren a membranas de nitrocelulosa las que posteriormente se incuban con las muestras de suero.

Utilizando esta técnica Arriaga y col. (Arriaga y col., 1989) encontraron que los sueros de cerdos infectados experimentalmente con Trichinella reconocen específicamente 5 proteínas del parásito con peso molecular de MW 72, 67, 52 y 47 Kd. El mismo patrón de reconocimiento se observó en cerdos infectados naturalmente (Arriaga y col., 1991).

Por otro lado, Sue y Prescott (1991) mostraron que la inmunoelectrotransferencia es más específica que el ELISA usando productos de excreción-secreción y tan sensible como este ensayo porque la disposición en bandas en la inmunoelectrotransferencia puede ser interpretado como positivo cuando la reacción presenta una disposición específica en bandas.

El diagnóstico post-mortem de la triquinosis tradicionalmente se ha hecho por métodos directos que establecen la presencia de larvas del parásito en muestras de tejido, tales como la Triquinoscopia o la digestión artificial. (Arriaga y col., 1992; Pozio y col., 1989).

A) TRIQUINOSCOPIA.- El examen se realiza con un triquinoscopio, el cual es un microscopio proyector, como portaobjetos se utilizan las placas compresoras. Las muestras deben ser pequeñas (5g) y de cada muestra se toman 7 trocitos, colocándolos en los campos, después se cubren con la placa superior, se acoplan con movimiento de

roce y accionando los tornillos se comprime. Todo se realiza llevando un orden determinado y observando primero el jugo de la carne expedido en la compresión y luego la zona marginal y la preparación propiamente dicha.

En la observación hay que prestar atención a las diferentes formas en que puede presentarse la larva muscular, ya que puede observarse estirada, enrollada, encapsulada y calcificada.

Sin embargo por este método no se pueden detectar infecciones mínimas, o sea las menores de un parásito por gramo. Algunos investigadores consideran que el grado mínimo de detección son 3 larvas musculares por gramo, por lo tanto al emplearse una mínima porción muscular para realizar el examen, puede dar en muchos casos resultados negativos falsos (Acha, 1986).

B) COMPRESION HISTOLOGICA.- EL examen mediante la compresión de músculo en placa, da información confiable. Pero, al igual que la triquinoscopia, falla cuando se presentan infecciones tempranas y ligeras.

En esta técnica las muestras de tejido se presionan entre portaobjetos y se examinan directamente al microscopio a 40 y 100 aumentos.

En casos dudosos, como cuando las larvas musculares aparecen sin enrollarse, cuando no se han encapsulado o aparecen en el jugo de la musculatura comprimida, pueden pasar desapercibidos y en estos casos se recomienda usar campo oscuro o contraste de fase (Salazar y Hara, 1986).

C) EXAMEN MICROGRAFICO.- La modificación de este método consiste en aclarar la preparación con potasa, recomendándose una solución de KOH al 10% en agua.

El trocito de músculo se corta de 1mm de espesor y se sumerge en la solución alcalina durante 30 minutos, después se pasa a las placas compresoras y el tejido se observa al microscopio (Ajenjo, 1980).

D) DIGESTION ARTIFICIAL.- La digestión artificial es una prueba donde se lleva a cabo la digestión del tejido muscular en solución de ácido clorhídrico al 1% y pepsina al 1% a una temperatura de 37°C durante 3 horas, después se filtra la muestra y por sedimentación se separan las larvas (Dennis y col., 1970).

E) XENODIAGNOSTICO.- Consiste en alimentar animales de laboratorio con carne sospechosa de estar infectada y después del tiempo indicado, sacrificar los animales para buscar la presencia de larvas en sus musculos (Herrera, 1985).

CLASIFICACION TAXONOMICA DE LAS FAMILIA Canidae Y Felidae:

REINO:	Animal	Tienen movimiento propio y nutren de otras materias orgánicas animales o vegetales.
SUBREINO:	Metazoa	Animales pluricelulares.
PHILUM:	Chordata	Animales con notocordia en alguna fase de su desarrollo.
SUBPHILUM:	Vertebrata	Animales con columna vertebral.
CLASE:	Mammalia	Animales que alimentan a sus crías con leche de las mamas.
SUBCLASE:	Theria	Mamíferos cuyos embriones se desarrollan dentro del útero.
INFRACLASE:	Eutheria	Mamíferos que producen una placenta
ORDEN:	Carnivora	Animales que se alimentan de carne principalmente.
SUBORDEN:	Fisípedos	Animales con dedos separados.

Aquí es donde se diferencian las 2 familias:

FAMILIA Canidae:

Carnívoros típicos, los cánidos no han alcanzado, sin embargo, el grado de carnivorismo de sus parientes los félidos, y muchos se adaptan con facilidad a un régimen más o menos omnívoro. Los bordes de los molares no son exclusivamente cortantes, sino que presentan una superficie plana que se emplea para masticar los

alimentos que no requieren ser desgarrados. Pese a todo, las muelas carniceras están muy diferenciadas. De tamaño mediano y cola larga; destacan por su hocico alargado y fino y por el volumen de su caja craneana que alberga un encéfalo muy desarrollado, en particular los lóbulos olfativos, en función del fabuloso desarrollo de este sentido. Efectivamente, gracias al olfato pueden dar caza a sus presas y escapar de sus enemigos, así como, debido al olor de la secreción de sus numerosas glándulas tegumentarias, localizarse unos a otros, excitarse sexualmente y delimitar sus territorios.

Estos animales son grandes corredores que persiguen muchas veces a sus víctimas hasta el agotamiento. La digitigradía es perfecta, existiendo almohadillas en la base de los dedos. Las patas largas terminan en 4 dedos, aunque en las anteriores exista un quinto rudimentario que no llega a apoyarse en el suelo y ha desaparecido en el Licaón. Las uñas cortas, no retráctiles ni cortantes, jamás se utilizan como garras, constituyendo la boca un auténtico aparato prensor y el arma principal de estos animales. Como ocurre en los demás carnívoros, el estómago es sencillo y el intestino relativamente corto; pero, a diferencia de otras familias pertenecientes al mismo orden, los cánidos tienen ciego intestinal.

Los cachorros, en número de 1 a 16 según las especies, nacen muy retrasados y mantienen largo tiempo el contacto con sus padres, prolongando algunas veces una vida social notable. Dada su adaptabilidad los cánidos tienen una distribución cosmopolita, pues poblaron prácticamente todo el mundo excepto Oceanía, donde fueron introducidos en tiempos prehistóricos por el hombre. Entre los géneros más importantes tenemos: Canis que incluye los Perros, Lobos, Chacales y Coyotes; Vulpes, que incluye los Zorros, y Lycaon, que incluye los Licaones africanos (Fauna, 1979; Mundo Animal, 1988).

FAMILIA Felidae:

La notable familia de los félidos, extendida por todo el mundo excepto Madagascar y Oceanía, se ha distribuido, gracias a su escasa especialización, por los más variados hábitats terrestres. El velocísimo guepardo comparte las estepas y sabanas herbosas con el gregario león. En los bosques y matorrales actúan el jaguar y el leopardo. En las colinas rocosas caza el puma, y el irbis en las montañas de nieves perpetuas. A tan cosmopolita adaptabilidad, los félidos suman una gran diversidad de tamaños, desde el pequeño gato de patas negras sudafricano, más pequeño que un gato doméstico, al gran tigre del Amur, con más de 300 kilos de peso, lo que les permite abatir una gama de presas que va desde el ratón o el pajarillo hasta el gigantesco búfalo cafre.

Los félidos son los más carnívoros entre todos los carnívoros y los mejores adaptados a la caza. Su poderoso sistema muscular les capacita para hacer grandes esfuerzos, pero, dado el considerable gasto de energía que éstos suponen, solamente durante un corto tiempo. Es por esta razón que no cazan persiguiendo sus presas hasta agotarlas, sino que lo hacen al acecho, esperando que pasen por su proximidad, o mejor, en términos cinéticos, al rececho, esto es, acercándose a ellas silenciosamente para sorprenderlas a corta distancia y darles muerte con gran rapidez. Cualquiera de estos procedimientos requiere unas condiciones físicas que estos animales cumplen a la perfección. En primer lugar es necesario localizar la presa, y para ello se valen de la extraordinaria finura de su vista, tanto durante el día como en la oscuridad. Los ojos, con pupilas oblicuas, se han desplazado hacia el frente, lo que permite una más amplia visión binocular, y por ello mejor distinción del relieve y buena apreciación de las distancias. También está muy desarrollado el oído -muy útil en la espesura, donde la vista no puede alcanzar muy lejos-, pero en cambio el olfato es mediocre.

Les conviene, en segundo lugar, pasar inadvertidos, no ser vistos por el animal escogido como presa que, de otra manera, podría huir. Por ello los félidos lucen

camufladores diseños cromáticos en la capa, ya a base de manchas, como en leopardos y guepardos, de rayas, como en los tigres, o de uniformes tonalidades homocromas, como en los leones.

También es indispensable para el rececho la marcha silenciosa, conseguida por la retracción de las uñas, que no rozan el suelo al caminar, y mediante unas almohadillas digitales que, colocadas en las bases de los dedos (5 en las patas anteriores y 4 en las posteriores), amortiguan el impacto de éstos contra el terreno. Naturalmente, tal especialización se opone al mantenimiento de una gran velocidad durante largo tiempo, pues unas uñas no retráctiles, al clavar en la tierra, constituyen para el animal que las posee -del mismo modo que los clavos de la zapatilla para el atleta- un formidable punto de apoyo con que iniciar una zancada. Ahora bien, como ya hemos dicho, los félidos no necesitan recorrer grandes distancias para cazar, y el único que lo hace, el guepardo, tiene las uñas romas y no puede retraerlas.

La utilización de todos sus recursos para acercarse a las presas se completa en los félidos con una extraordinaria eficacia cazadora. Las uñas, encerradas en su vaina, no sufren ningún desgaste o rozamiento y constituyen unas afiladas y formidables armas, en tanto que la relativa libertad del pulgar les capacita para atrapar pequeñas presas, como hace el lince al coger un ave al vuelo, o el gato a un ratón al salto. El acortamiento de la región facial del cráneo, de forma globosa, permite una mejor distribución de las fuerzas ejercidas por los músculos insertos en la cabeza, concediendo así un enorme poder a las mandíbulas, articuladas con el hueso temporal mediante una sólida charnela que no permite movimientos laterales y concede al aparato masticador la rigidez de un cepo. En general estos animales utilizan las garras para cazar, sirviéndose de ellas para derribar y sujetar sus presas mientras las rematan, casi siempre por estrangulación, haciendo una sólida presa con sus mandíbulas en la garganta de la víctima.

Actualmente se agrupan los félidos en 4 géneros: Felis que incluye al puma, al jaguarundi y al ocelote; Lynx que incluye a los lince; Acinonyx que incluye al guepardo y Panthera que incluye al jaguar, al león, al tigre y al leopardo (Fauna, 1979; Mundo Animal, 1988).

OBJETIVOS

Determinar la presencia de anticuerpos específicos contra Trichinella spiralis y Trichinella nativa en sueros de cánidos y félidos silvestres albergados en el Zoológico de Chapultepec empleando los ensayos de ELISA e Inmunoelectrotransferencia.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de muestras:

Se tomaron muestras de sangre de los cánidos y félidos silvestres albergados en el Zoológico de Chapultepec y a partir de estas se separó el suero. Los animales muestreados son: 1.1 lobos del Artico (*Canis lupus hudsonicus*), 1.1* lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), 0.1 lobo mexicano híbrido (*Canis lupus baileyi*), y 0.1 lobo azul (*Canis lupus*), 5.2 coyotes (*Canis latrans*), 3.6 zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), 4.2 jaguares pintos (*Panthera onca*), 2.1 jaguares negros (*Panthera onca*), 4.6 leones africanos (*Panthera leo*), 1.1 tigres de bengala blancos (*Panthera tigris*), 4.4 tigres de bengala (*Panthera tigris*), 0.1 tigre siberiano (*Panthera tigris*), 3.5 leopardos (*Panthera pardus*), 3.3 panteras negras (*Panthera pardus*), 0.2 linceos rojos (*Lynx rufus*), 2.3 pumas (*Felis concolor*), 1.0 jaguarundi (*Felis yagouaroundi*) y 1.0 ocelote (*Felis pardalis*). (*Clave utilizada para abreviar sexos de las diferentes especies de animales siendo 1.0 el macho y 0.1 la hembra).

Para la toma de muestras se utilizó el siguiente material: 1 jaula de compresión, redes, 1 laza-perros, 75 jeringas de 10 ml, 75 agujas del #20, 75 tubos de ensayo estériles, 1 centrifuga. En los casos requeridos se utilizó Ketamina (Imalgen Lab. Rhone Merieux) y Xilacina (Rompún Lab. Bayer) y Yohimbina (Antagonyl Lab. Wildlife) para la inmovilización química.

El procedimiento para la toma de muestras fué el siguiente: Los coyotes y zorras grises fueron inmovilizados físicamente con la ayuda de redes y laza-perros, todos los lobos no pudieron ser contenidos físicamente y fueron inmovilizados químicamente utilizando las siguientes dosis: 5mg/kg de peso corporal de Ketamina (Imalgen) y 2mg/kg de peso corporal de Xilacina (Rompún) y se antagonizaron con Yohimbina (Antagonyl) a una dosis de 0.1 mg/kg. La muestra de sangre se obtuvo de la vena cefálica, todos los félidos se inmovilizaron químicamente utilizando las siguientes dosis: 5mg/kg de peso

corporal de Ketamina (Imalgen) y 1mg/kg de peso corporal de Xilacina (Rompún) y se antagonizó con Yohimbina (Antagonyl) a una dosis de 0.1 mg/kg. La muestra de sangre se obtuvo de la vena femoral, tomando aproximadamente 10 ml de sangre depositándola posteriormente en el tubo de ensaye estéril sin aguja y resbalándolo por la pared del tubo para evitar hemólisis. Posteriormente la muestra fué centrifugada a 2000 RPM durante 5 minutos para separar el suero el cual fué conservado en congelación hasta su utilización en los ensayos.

Como muestras control se incluyeron sueros de 0.1 oso polar (Ursus maritimus) infectada con Trichinella nativa como control positivo y de 0.1 oso polar (Ursus maritimus) libre de la enfermedad como control negativo.

Obtención de las larvas musculares de Trichinella:

La obtención de larvas musculares de T. nativa y T. spiralis se llevó a cabo empleando digestión artificial de ratones BALB/c infectados con cada uno de los aislados siguiendo la metodología descrita por Dennis y col. (1970). En ésta se maceró perfectamente la carne y se empleó una solución al 1% de Pepsina y 1% de HCl previamente preparada y la digestión se llevó a cabo a una temperatura de 37°C durante 3 horas. Después de digerida la muestra se pasó por un tamiz, se dejó sedimentar y una muestra del sedimento se observó al microscopio para la detección de larvas musculares, las cuales se lavaron 3 veces con amortiguador de fosfatos salinos y se conservó el paquete de larvas a 37°C en la misma solución.

Obtención del antígeno:

Para la obtención del extracto crudo de larva muscular de Trichinella nativa y T. spiralis se utilizó el método descrito por Parkhouse y col. (1981). En éste, el paquete de larvas se homogeneizó con un homogenizador de tejidos en solución amortiguadora de Trisma base 10 mM pH 8.13 con inhibidores de proteasa (TPCK 50 µg/ml, TLCK 25

$\mu\text{g/ml}$ y PMSF 174 $\mu\text{g/ml}$) en frío, durante 30 minutos. Posteriormente se agregó Desoxicolato de sodio al 10% hasta una concentración final del 2% y se continuó la homogeneización durante 15 minutos: se dejó en reposo durante 30 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó a 12000 RPM durante 30 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante en alícuotas a -20°C hasta su uso. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas en el antígeno mediante el método de Lowry descrito por Dolley y Grieve (1975).

ELISA empleando antígeno total:

La presencia de anticuerpos contra *I. nativa* y *I. spiralis* en los sueros colectados se determinó mediante ensayos de ELISA utilizando placas de microtitulación de fondo plano, según la técnica descrita por Arriaga y col. (1989). En estas, se acopló el antígeno de *I. nativa* y *I. spiralis* depositando 100 μl de extracto crudo de larva muscular a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ en cada pozo dejándose incubar toda la noche a 4°C. En seguida se bloquearon los sitios donde no se adhirió el antígeno llenando los pozos con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) conteniendo albúmina sérica bovina al 0.5% y Tween 20 al 0.5% por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó 3 veces con solución de lavado conteniendo PBS-Tween 20 al 0.5% dejando pasar entre lavado y lavado 3 minutos. Una vez realizado esto, se adicionaron los sueros problema a una dilución de 1:50 en solución PBS-BSA-Tween 20 al 0.5% incluyendo los controles positivo y negativo, incubándose durante 1 hora a 37°C para favorecer la formación del complejo Ag-Ac y se lavó 3 veces nuevamente de la manera descrita anteriormente. Posteriormente, se agregaron 100 μl de una dilución 1:4000 de conjugado de proteína A/G-peroxidasa en PBS-BSA-Tween 20 al 0.5% durante 1 hora a 37°C, se lavó 3 veces nuevamente con solución de lavado. Finalmente se adicionó la solución de revelado que contiene: 0.04% de O-fenilendamina y 0.04% de agua oxigenada en amortiguador de fosfatos-citratos pH

5.0, colocando 100 µl por pozo, dejando pasar aproximadamente 10 minutos hasta que se notó un color amarillo con tono bajo. Posteriormente se añadieron a cada pozo 50 µl de H₂SO₄ 2.5M para detener la reacción. Una vez que se terminó de depositar la solución de paro se colocó la placa en un lector de ELISA (Dynatec) y se hizo la lectura a 492 nm.

ELISA empleando antígeno purificado de superficie/esticosoma o con antígenos de secreciones-excreciones de T. spiralis:

Estas pruebas solamente se aplicaron a los individuos que dieron valores de D.O. elevados o en el límite de positividad en el ensayo de ELISA empleando el extracto total como fuente de antígeno. Este ensayo se realizó con la finalidad de detectar anticuerpos específicos para T. spiralis y evitar posibles reacciones cruzadas con otros parásitos. Para la realización de estas pruebas se utilizó la misma metodología descrita anteriormente con antígeno total utilizando antígenos purificados de superficie/esticosoma o componentes de secreciones-excreciones a una concentración de 5µg/ml y la concentración del conjugado de proteína A/G peroxidasa fue 1:3000.

Inmunolectrotransferencia:

Con el objeto de determinar el reconocimiento de antígenos del parásito por sueros de los animales incluidos en este estudio se llevó a cabo el ensayo de inmunolectrotransferencia empleando extractos totales de larvas musculares de T. nativa y T. spiralis, el cual se realizó de acuerdo al método descrito por Arriaga y col. (1989). Los componentes de la larva muscular del parásito se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Los sitios no ocupados se bloquearon con una solución de albúmina al 3% en PBS. Posteriormente las membranas se cortaron en tiras, las cuales se incubaron cada una en un tubo de ensayo con tapón de rosca con

la solución de incubación que contiene: 100 µl de PBS 10X, 200 µl del Stock 5X, 100 µl de suero fetal bovino, 100 µl del suero problema (dilución 1:10) y 500 µl de agua. Se dejó incubar a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se lavó cada tira 3 veces 3 minutos cada vez con PBS Tritón al 1%. Después se agregó el conjugado de proteína A/G peroxidasa en PBS 1X y suero fetal bovino a una dilución de 1:500. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló empleando como sustrato una solución al 0.05% de 2,4-dloro-1-naftol a la que se añadió agua oxigenada al 0.03%. Una vez que se detectaron las bandas la reacción se paró adicionando agua destilada, posteriormente se secaron las tiras y se compararon con los pesos moleculares.

RESULTADOS

En el Zoológico de Chapultepec falleció una osa polar. Al practicar la necropsia se observó un gran número de larvas enquistadas en músculos de todo el cuerpo principalmente en diafragma. Con base en la observación macroscópica se tomaron muestras de tejido muscular infectado las cuales fueron comprimidas entre dos portaobjetos y al realizar la observación microscópica se pudo observar la presencia de larvas enquistadas cuya morfología era similar a la de larvas musculares del género Trichinella (Fig. 4). Posteriormente se tomó una muestra de 120g de músculo infectado y se sometió a digestión artificial con HCl y Pepsina al 1%, obteniéndose aproximadamente 3500 larvas, las cuales fueron empleadas para infectar ratones BALB/c, y así mantener el aislado de la osa para posteriores estudios. Con la finalidad de determinar la especie del parásito infectante se envió el tejido muscular de dos ratones al Centro de Referencia para Triquinelosis localizado en Roma, Italia. Así por análisis de 27 alozimas y del DNA, las larvas musculares fueron identificadas como Trichinella nativa.

A partir de otros ratones infectados con T. nativa se obtuvieron larvas musculares por digestión artificial obteniéndose un paquete de 0.2 ml de larvas, a partir del cual se preparó el extracto total, siguiendo la metodología descrita en material y métodos. Paralelamente se obtuvieron larvas musculares de T. spiralis mantenidas en ratones BALB/c en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN y el extracto total se obtuvo de la misma forma que el de T. nativa.

Para determinar la concentración de proteína de los 2 extractos se utilizó el método de Lowry modificado. Empleando esta técnica se determinó para el extracto de T. nativa una concentración de 7.3 mg/ml y de 8.75 mg/ml para el extracto obtenido de T. spiralis.

Los extractos totales de los aislados de *T. nativa* y *T. spiralis* se analizaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, observándose patrones muy semejantes (fig. 5). Así mismo, es evidente que ambas preparaciones se obtuvieron sin degradación.

Por otra parte los extractos totales se separaron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a papeles de nitrocelulosa en la forma descrita en material y métodos. Las tiras de nitrocelulosa se reaccionaron con el suero de la osa infectada con *T. nativa* y como control positivo un suero de cerdo infectado experimentalmente, observándose principalmente el reconocimiento de componentes de *T. spiralis* de peso molecular 105, 72, 67, 52, y 47 kDa (fig. 6, carriles 1 y 2) y componentes de *T. nativa* de 105, 67, 52 y 47 kDa (fig. 6, carriles 4 y 5). Como control negativo se utilizó el suero de otra osa no infectada, lo cual se comprobó por serología y biopsia muscular, este suero no mostró reactividad (fig. 6, carriles 3 y 6) hacia estos componentes.

Con objeto de determinar la presencia de anticuerpos contra *Trichinella* en los sueros de cánidos y félidos colectados en el Zoológico de Chapultepec, se desarrolló un ensayo de ELISA utilizando los extractos totales de *T. spiralis* y *T. nativa* y proteína A/G acoplado a peroxidasa. Se incluyeron en este ensayo suero de la osa infectada con *T. nativa* y suero de la osa no infectada, como controles positivo y negativo, respectivamente. Para estandarizar el ensayo de ELISA se probaron varias diluciones de la proteína A/G acoplado a peroxidasa, determinándose que esta debería utilizarse diluida a 1:4000 y los sueros de los animales en dilución 1:50.

Mediante ensayos de ELISA empleando las 2 preparaciones antigénicas se analizaron sueros de 6 lobos, 7 coyotes, 9 zorras grises, 9 jaguares, 10 leones africanos, 10 tigres de bengala, 1 tigre siberiano, 8 leopardos, 6 panteras negras, 2 linces rojos, 5 pumas, 1 jaguarundi y 1 ocelote. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos se muestran en la tabla I.

El punto de corte en estos ensayos se calculó considerando la media de los valores de D.O. obtenidos con sueros que en el ensayo de inmunoelectrotransferencia

no mostraron reactividad, más 3 desviaciones estándar. El punto de corte del ensayo de ELISA con el extracto total de *I. nativa* fue de 0.667 (fig. 7, columna 1) y de 0.561 con *I. spiralis* (fig. 7, columna 2). En base a esto se observó que un 24% y 22.6% de los sueros fueron positivos con los antígenos totales de *I. nativa* y *I. spiralis* respectivamente.

Los sueros que resultaron positivos fueron analizados por ELISA utilizando antígenos purificados de superficie/esticosoma y de secreción/excreción de la larva muscular de *I. spiralis* (tabla 1).

Los puntos de corte calculados en estos ensayos fueron 1.113 con antígeno purificado de superficie/esticosoma (fig. 7, columna 3) y 0.511 con antígeno de secreciones-excreciones (fig. 7, columna 4), obteniéndose un 12% y 14.6% de sueros positivos respectivamente.

El análisis por inmunoelectrotransferencia se realizó con las muestras que resultaron positivas en ELISA tanto con extractos totales como con antígenos purificados, así como con algunas muestras que tuvieron valores de D.O. por debajo del punto de corte. Se incluyeron también como controles positivo y negativo sueros de la osa polar infectada con *I. nativa* y la no infectada.

En este ensayo, las muestras positivas por ELISA, presentaron reactividad hacia varios componentes de la larva muscular de *I. nativa* y *I. spiralis*. Se observó el reconocimiento principalmente de 4 antígenos de la larva muscular de *I. nativa* con peso molecular de 105, 67, 52, y 47 kDa (fig. 8, carriles 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 21 y 22). Este patrón de reconocimiento antigénico fue semejante al que presentaron el suero de un cerdo infectado experimentalmente con *I. spiralis* y el suero de la osa polar infectada en la que se demostró la presencia de larvas musculares de *I. nativa* (fig. 8 carriles 1 y 2). Los sueros de la osa polar no infectada y de cánidos y félidos en ELISA no mostraron reactividad hacia estos componentes (fig. 8, carriles 3, 8, 11, 13, 15, 17 y 20).

Las muestras de sueros positivos a el ELISA mostraron también reactividad principalmente hacia componentes de *T. spiralis* con peso molecular de 105, 72, 67, 52 y 47 kDa (fig. 9 carriles 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 14, 17, 18, 19, 21 y 22), semejante a la que presentaron los sueros de cerdo infectado experimentalmente y de la osa polar infectada (fig. 9, carriles 1 y 2), mientras que los sueros de cánidos y félidos negativos en ELISA no reconocieron estos componentes (fig. 9, carriles 3, 8, 11, 13, 15, 16 y 20). Así se tiene que de 75 muestras serológicas, 17 resultaron positivas por la prueba de inmunoelectrotransferencia lo que equivale a un 22.66% de positividad (tabla 2).

El análisis del número de animales infectados de cada especie se muestra en la tabla 3, donde se observa que el grupo de animales que presentó el porcentaje más alto de positividad fue el de los lobos con un 83.36%, seguido de jaguares (33.33%), leones africanos (30%), tigres de bengala (30%), coyotes (24.58%) y zorras grises (11.11%), mientras que los grupos de tigre siberiano, leopardos, panteras negras, linceos rojos, pumas, jaguarundi y ocelote no presentaron ningún animal positivo.



FIGURA 4
LARVAS MUSCULARES DE *T. nativa* ENQUISTADAS EN TEJIDO
MUSCULAR DE LA OSA POLAR. Las larvas musculares fueron observadas al
microscópio óptico por compresión histológica a 40X utilizando un contraste de fase.

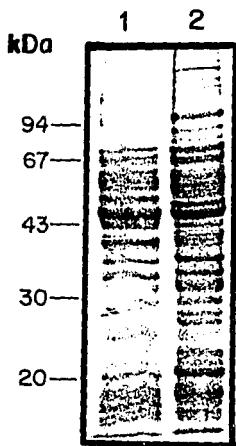


FIGURA 5
ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE
LARVA MUSCULAR DE *T. spiralis* Y *T. nativa* Los extractos totales fueron
 separados por SDS PAGE en geles de poliacrilamida al 10%. Una vez separadas las
 proteínas se tiñeron con Azul de Coomasee. Carril 1.- Extracto total de *T. spiralis*
 Carril 2.- Extracto total de *T. nativa*

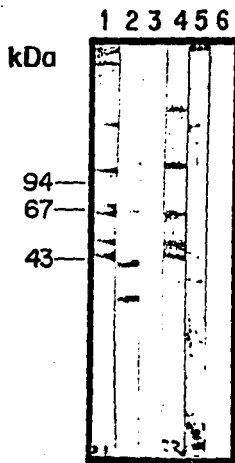


FIGURA 6
PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO OBTENIDOS POR
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON SUEROS DE CERDO Y OSA
POLAR INFECTADOS CON *Trichinella* Y OSA POLAR NO INFECTADA.
 Los extractos totales de *T. spiralis* (carriles 1-3) y de *T. nativa* (carriles 4-6) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (NC). Las tiras de NC se pusieron a reaccionar con los sueros de cerdo infectado experimentalmente con *T. spiralis* (carriles 1 y 4), de osa polar infectada con *T. nativa* (carriles 2 y 5) y de osa polar no infectada (carriles 3 y 6) diluidos 1:10. Como segundo anticuerpo se empleó un conjugado de proteína A/JG acoplado a peroxidasa diluido 1:500. El peso molecular de los marcadores empleados como estándares se indican en la figura.

TABLA I
VALORES DE DENSIDAD OPTICA OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE
ELISA EMPLEANDO SUEROS DE CANIDOS Y FELIDOS Y 3
PREPARACIONES ANTIGENICAS

INDIVIDUO	<u>T.nat.</u>	<u>T.sp.</u>	sup/est	sec-exc
oso polar 1	1.906p	1.730p	1.858p	1.535p
oso polar 2	0.163n	0.164n	0.253n	0.275n
lobo 1	0.739*	1.210*	1.286*	0.474
lobo 2	1.366*	0.811*	1.675*	0.696*
lobo 3	0.202	0.254	0.727	0.390
lobo 4	1.048*	1.144*	0.283	0.314
lobo 5	2.000*	0.973*	0.888	0.528*
lobo 6	0.497	0.790*	0.461	0.458
coyote 1	0.700*	1.046*	0.608	0.404
coyote 2	0.648	0.828	0.694	0.423
coyote 3	0.712*	0.498		0.711*
coyote 4	0.230	0.150	0.520	
coyote 5	0.522	0.590*	0.495	0.449
coyote 6	0.307	0.234	0.613	0.654
coyote 7	0.394	0.278	0.249	0.262
zorrra gris 1	0.292	0.256		
zorrra gris 2	0.233	0.463		
zorrra gris 3	0.342	0.788*	0.132	0.312
zorrra gris 4	0.305	0.262		
zorrra gris 5	0.106	0.089	0.338	
zorrra gris 6	0.260	0.358		
zorrra gris 7	0.212	0.252		
zorrra gris 8	0.732*	0.527	0.524	0.380
zorrra gris 9	0.074	0.029		
jaguar 1	1.778*	2.000*	2.000*	1.483*
jaguar 2	0.812*	0.712*	0.317	0.544*
jaguar 3	0.330	0.256	0.495	0.470
jaguar 4	0.267	0.242		
jaguar 5	0.563	0.674*	0.869	0.349
jaguar 6	0.234	0.180		
jaguar 7	0.192	0.366	0.291	0.163
jaguar 8	0.502	0.446	0.314	0.210
jaguar 9	0.248	0.389		
león 1	0.031	0.107		
león 2	0.681*	0.892*	1.267*	0.836*

INDIVIDUO	I.nat.	I.sp.	sup/est	sec-exc
león 3	1.354*	2.000*	1.756*	1.285*
león 4	0.270	0.288		
león 5	0.284	0.327		
león 6	1.222*	0.480	1.272*	0.680*
león 7	0.210	0.178	0.573	0.319
león 8	0.158	0.168		
león 9	0.217	0.320	1.243*	
león 10	0.207	0.144		
tigre 1	0.208	0.274	0.596	0.244
tigre 2	0.354	0.216	0.485	0.391
tigre 3	1.053*	1.271*	0.342	0.238
tigre 4	0.279	0.295		
tigre 5	0.696*	0.597*	0.395	0.220
tigre 6	0.522	0.452	0.763	0.302
tigre 7	1.156*	0.702*	1.181*	0.590*
tigre 8	1.042*	0.832*	1.232*	0.494
tigre 9	1.215*	1.076*	0.925	1.034*
tigre 10	0.429	0.133	0.710	0.398
tigre siberiano	0.385	0.216	0.303	0.230
leopardo 1	0.116	0.070		
leopardo 2	0.107	0.098		
leopardo 3	0.408	0.504	0.765	0.274
leopardo 4	0.293	0.110	0.535	0.406
leopardo 5	0.556	0.900*	0.512	0.554*
leopardo 6	0.232	0.195		
leopardo 7	0.308	0.288		0.248
leopardo 8	0.118	0.145		
pantera 1	0.202	0.100		
pantera 2	0.167	0.155		
pantera 3	0.425	0.174	0.305	0.356
pantera 4	0.262	0.178	0.729	0.483
pantera 5	0.750*	0.356	0.454	0.361
pantera 6	0.124	0.100		
lince rojo 1	0.206	0.119		
lince rojo 2	0.114	0.049		
puma 1	0.392	0.155	0.467	0.410
puma 2	0.406	0.302	0.493	0.234
puma 3	0.295	0.154		
puma 4	0.203	0.174		
puma 5	0.130	0.098		
jaguarundi	0.164	0.127		0.246
ocelote	0.288	0.119		0.440

T.nat. = extracto total de larva muscular de T. nativa
T.sp. = extracto total de larva muscular de T. spiralis
sup/est = antígeno de superficie/esticosoma
sec-exc = productos de secreción-excreción de T. spiralis
p = control positivo
n = control negativo
* = valor superior al punto de corte

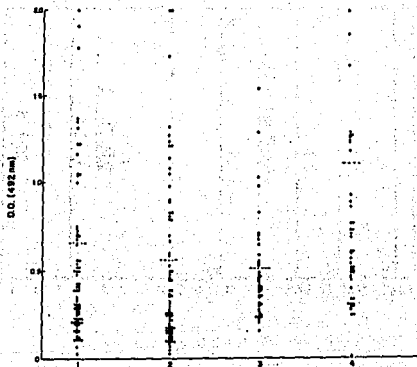


FIGURA 7
VALORES DE DENSIDAD OPTICA DE SUEROS DE CANIDOS Y FELIDOS DEL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC OBTENIDOS EN EL ENSAYO DE ELISA CON ANTIGENOS DE *Trichinella* Columna 1.-Antígeno total de *T. nativa*. Columna 2.-Antígeno total de *T. spiralis*. Columna 3.-Antígeno purificado de superficie/esticosoma de *T. spiralis*. Columna 4.-Antígeno de secreción-excreción de *T. spiralis*. La línea punteada indica el punto de corte calculado considerando la media de los valores de D.O. obtenidos con sueros que en el ensayo de inmunoelectrotransferencia no mostraron reactividad más 3 desviaciones standard.

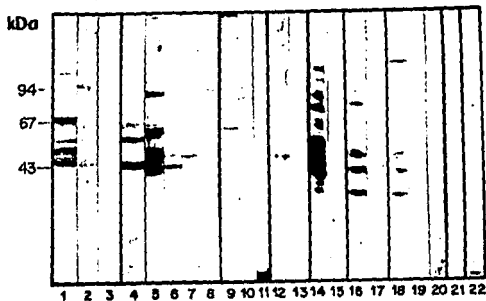


FIGURA 8
PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO OBTENIDOS POR
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON SUEROS DE CANIDOS Y
FELIDOS DEL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC EMPLEANDO
ANTIGENO TOTAL DE *T. nativa*. El extracto total de *T. nativa* se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfirió a papel de nitrocelulosa (NC). Los sueros de cánidos y félidos se diluyeron 1:10 y se reaccionaron con las tiras de NC; como segundo anticuerpo se empleó la proteína A/G acoplada a peroxidasa diluido 1:1000. Carril 1.- cerdo positivo, Carril 2.- oso polar 1 (control positivo), Carril 3.- oso polar 2 (control negativo), Carril 4.- lobo 1, Carril 5.- lobo 2, Carril 6.- lobo 6, Carril 7.- lobo 4, Carril 8.- lobo 3, Carril 9.- coyote 2, Carril 10.- coyote 3, Carril 11.- Coyote 6, Carril 12.- zorra gris 8, Carril 13.- zorra gris 9, Carril 14.- jaguar 1, Carril 15.- jaguar 6, Carril 16.- león 3, Carril 17.- león 7, Carril 18.- tigre 3, Carril 19.- tigre 9, Carril 20.- tigre 1, Carril 21.- leopardo 5, Carril 22.- leopardo 3.

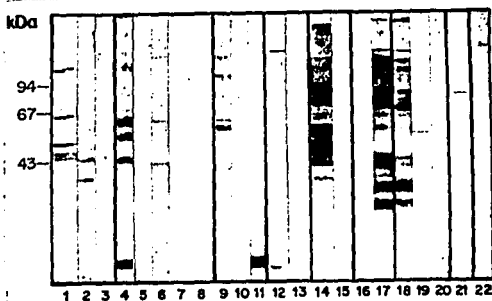


FIGURA 9
PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO OBTENIDOS POR
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON SUEROS DE CANIDOS Y
FELIDOS DEL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC EMPLEANDO
ANTIGENO TOTAL DE *I. spiralis*. El extracto total de *I. spiralis* se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfirió a papel de nitrocelulosa (NC). Los sueros de cánidos y félidos se diluyeron 1:10 y se reaccionaron con las tiras de NC; como segundo anticuerpo se empleó la proteína A/G acoplada a peroxidasa diluido 1:1000. Carril 1.- cerdo positivo, Carril 2.- oso polar 1 (control positivo), Carril 3.- oso polar 2 (control negativo), Carril 4.- lobo 1, Carril 5.- lobo 2, Carril 6.- lobo 6, Carril 7.- lobo 4, Carril 8.- lobo 3, Carril 9.- coyote 2, Carril 10.- coyote 3, Carril 11.- Coyote 6, Carril 12.- zorra gris 8, Carril 13.- zorra gris 9, Carril 14.- jaguar 1, Carril 15.- jaguar 6, Carril 16.- león 7, Carril 17.- león 3, Carril 18.- tigre 3, Carril 19.- tigre 9, Carril 20.- tigre 1, Carril 21.- leopardo 5, Carril 22.- leopardo 3.

TABLA 2
RESULTADOS OBTENIDOS EN ENSAYOS DE ELISA E
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON EXTRACTOS TOTALES DE
T. nativa* Y DE *T. spiralis

INDIVIDUO	Ensayo de ELISA		Western blot	
	T.nat.	T.sp.	T.sp.	T.nat.
oso polar 1	1.906p	1.730p	+	+
oso polar 2	0.163n	0.164n	-	-
lobo 1	0.739*	1.210*	+	+
lobo 2	1.366*	0.811*	+/-	+
lobo 3	0.202	0.254	-	-
lobo 4	1.048*	1.144*	-	+
lobo 5	2.000*	0.973*	+	+
lobo 6	0.497	0.790*	+	+
coyote 1	0.700*	1.046*	-	-
coyote 2	0.648	0.828	+	-
coyote 3	0.712*	0.498	+/-	+/-
coyote 4	0.230	0.150	-	-
coyote 5	0.522	0.590*	-	-
coyote 6	0.307	0.234	+/-	+/-
zorra gris 3	0.342	0.788*	-	-
zorra gris 5	0.106	0.089	-	-
zorra gris 8	0.732*	0.527	-	+/-
zorra gris 9	0.074	0.029	-	-
jaguar 1	1.778*	2.000*	+	+
jaguar 2	0.812*	0.712*	+/-	+/-
jaguar 3	0.330	0.256	-	-
jaguar 5	0.563	0.674*	+/-	+/-
jaguar 6	0.234	0.180	-	-
jaguar 7	0.192	0.366	-	-
jaguar 8	0.502	0.446	-	-
león 2	0.681*	0.892*	+/-	+/-
león 3	1.354*	2.000*	+	+
león 6	1.222*	0.480	+/-	+/-
león 7	0.210	0.178	-	-
tigre 1	0.208	0.274	-	-
tigre 2	0.354	0.216	-	-
tigre 3	1.053*	1.271*	+	+/-
tigre 5	0.696*	0.597*	-	-
tigre 6	0.522	0.452	-	-
tigre 7	1.156*	0.702*	+/-	+/-
tigre 8	1.042*	0.832*	-	-
tigre 9	1.215*	1.076*	+	+

INDIVIDUO	Ensayo de ELISA		Western blot	
	T.nat.	T.sp.	T.sp.	T.nat.
tigre siberiano	0.385	0.216	+/-	+/-
leopardo 3	0.408	0.504	-	-
leopardo 4	0.293	0.110	-	-
leopardo 5	0.556	0.900*	-	-
pantera 5	0.750*	0.356	-	-
puma 1	0.392	0.155	-	-
puma 2	0.406	0.302	-	-

* = Muestras positivas en ELISA. +/- = sueros con un patrón débil o con solo algunas bandas específicas

TABLA 3
PORCENTAJE DE MUESTRAS DE SUEROS POSITIVOS A *Trichinella* DE
LAS DIFERENTES ESPECIES DE CANIDOS Y FELIDOS DEL
ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC DETECTADAS POR PRUEBAS
INMUNOENZIMATICAS (ELISA E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA)

ESPECIE	TOTAL	POSITIVOS	%
Lobos	6	5	83
Coyotes	7	2	25
Zorras grises	9	1	11
Jaguars	9	3	33
Leones africanos	10	3	30
Tigre de Bengala	10	3	30
Tigre siberiano	1	0	0
Leopardos	8	0	0
Panteras negras	6	0	0
Linces rojos	2	0	0
Pumas	5	0	0
Jaguarundi	1	0	0
Ocelote	1	0	0

DISCUSION

La Trichinella spiralis presenta dos ciclos de vida, uno doméstico y otro silvestre. En el primero, la transmisión de la enfermedad al humano ocurre principalmente por el consumo de carne de cerdo infectada con la larva muscular del parásito. En el segundo, animales silvestres como zorras, tigres, osos, etc. pueden participar en esta transmisión ya que en algunas regiones la carne de varios mamíferos silvestres tradicionalmente ha formado una parte importante de la dieta. Ambos ciclos no son completamente independientes puesto que puede haber transmisión del parásito de un ciclo al otro. Así en la epidemiología de la triquinelosis, es especial el ciclo silvestre, contribuye a la gran dispersión de la parasitosis.

En estudios epidemiológicos realizados en Estados Unidos se encontró que Trichinella se transmite de cerdos domésticos a animales silvestres (ratas, mapaches, etc.) y a la vez los cerdos pueden ser infectados con algunos aislados silvestres. En estos estudios se probó la infectividad en cerdos de 17 aislados provenientes de animales silvestres, encontrándose que en general la infectividad de aislados de osos y zorras era muy baja, aunque en casos específicos de dos aislados de oso negro, así como con algunos aislados de castores y zorrillos, la infectividad fue comparable a la obtenida con aislados de cerdos (Murrell y col., 1987). De tal modo, es muy importante el considerar que los animales silvestres pueden actuar como reservorios para Trichinella, lo cual significa un serio obstáculo para el desarrollo de estrategias de control y erradicación de la triquinelosis.

Aunque varios estudios han demostrado que parásitos del género Trichinella pueden infectar distintas especies de animales silvestres, no existe mucha información sobre la frecuencia de la triquinelosis en animales de los zoológicos. En el Zoológico de Chapultepec se presentó el caso de una hembra de oso polar (Ursus maritimus) la cual en la necropsia presentó una gran cantidad de larvas musculares identificadas como T. nativa. Aunque la infección pudo ser adquirida en el lugar de origen cabe la posibilidad

de que haya ocurrido en el zoológico por consumo de alimento contaminado con larvas del parásito. Considerando estos aspectos se propuso realizar el presente trabajo para determinar la posible infección por Trichinella en los cánidos y félidos silvestres albergados en el Zoológico de Chapultepec los cuales consumen la misma carne de caballo.

Por otra parte, los datos que existen sobre la frecuencia de la triquinelosis en animales silvestres han sido obtenidos mediante digestión artificial de muestras de tejidos de estos animales. Sin embargo, estudios recientes realizados principalmente en cerdos han mostrado que los métodos de diagnóstico inmunoenzimático como el ELISA pueden ser de mucha utilidad para la detección de animales infectados (Arriaga y col., 1989; Gamble y col., 1983).

Los resultados obtenidos en este trabajo con los sueros de cánidos y félidos del zoológico de Chapultepec en la prueba de ELISA utilizando extractos totales de T. nativa o de T. spiralis, indicaron que 24% y 22.6% de las muestras de suero analizadas resultaron positivas. Sin embargo con el empleo de antígenos más definidos del parásito como son antígenos de superficie/esticosoma purificados y productos de secreción-excreción de la larva muscular de T. spiralis recientemente clasificados como TSLI, el porcentaje de positividad fue de 12% y 14.6% respectivamente. Considerando lo anterior es evidente que con los extractos totales de T. nativa y T. spiralis se obtiene reactividad cruzada con otros parásitos, lo cual se reduce con los antígenos purificados. Estos resultados concuerdan con lo que se ha observado anteriormente con sueros de cerdo (Arriaga, 1991; Arriaga y col., 1989).

Por otro lado, se ha demostrado que los animales infectados con Trichinella presentan un patrón de reconocimiento antigénico característico, mostrando reactividad principalmente hacia componentes de la larva muscular con pesos moleculares entre 45 y 105 kDa (Arriaga y col., 1989, 1991).

Al analizar por inmunoelctrotransferencia la reactividad de los sueros de cánidos y félidos positivos en ELISA, se observó reconocimiento de componentes muy definidos del parásito. El patrón obtenido fue semejante al observado en sueros de cerdo (Arriaga y col., 1989), sin embargo, en algunos casos se reconocieron algunos otros componentes antigénicos. Los patrones de reconocimiento obtenidos con *I. spiralis* y *I. nativa* fueron semejantes, lo que concuerda con lo observado por Gamble y col. (1984b). Estos autores mencionan que muchos epitopos son conservados en las distintas especies de *Trichinella*, aunque muchos de los sueros mostraron reactividad hacia un componente de 72 kDa presente en *I. spiralis* el cual no fue reconocido en los extractos de *I. nativa*. En general, los resultados de inmunoelctrotransferencia permitieron corroborar los resultados de ELISA, en forma semejante a lo que se ha observado en cerdos (Arriaga y col., 1989, Arriaga y col., 1991).

En estos estudios se encontró que por lo menos 12 a 15% de los cánidos y félidos muestreados en el Zoológico de Chapultepec presentaron anticuerpos específicos contra *Trichinella*. Esta infección pudo haber sido adquirida en el lugar de origen de los animales o bien pudo haber sido adquirida en el zoológico ya que el 82% de los animales estudiados nacieron en cautiverio o fueron traídos al Zoológico de Chapultepec a una edad muy temprana. Esta infección pudo ser causada por la ingestión de roedores infectados o por la carne de caballo suministrada como alimento. Esta última posibilidad parece factible ya que por lo menos nueve de los últimos brotes de triquinelosis humana que han ocurrido en Europa han sido provocados por consumo de carne de caballo infectada por el parásito (Dupouy-Camet y col., 1994). Además, un muestreo preliminar realizado en un rastro de caballos del Estado de México mostró la presencia de larvas de *I. spiralis* en cuatro animales (C. Arriaga, comunicación personal).

El grupo de animales que mostró mayor número de positivos fue el de los lobos (83%) seguido por los jaguares (33%), leones africanos (30%), tigres de bengala (30%),

coyotes (25%) y zorras grises (11%). Esto concuerda con estudios anteriores que han mostrado mayor frecuencia de infección por Trichinella en los lobos que en otros grupos de animales silvestres (Scaramozzino y col., 1994). Se ha sugerido que los lobos al estar en la parte superior de la cadena alimentaria, amplificarían las infecciones por Trichinella y en esta forma servirían como animales centinelas (Stancampiano y col., 1994). De igual forma podrían ser considerados los jaguares, leones africanos y tigres de bengala ya que ellos también ocupan la parte superior de la cadena alimenticia de la zona climática a la cual pertenecen.

Con este trabajo se demostró la presencia de la triquinosis dentro del Zoológico de Chapultepec, siendo este uno de los primeros trabajos hechos con animales en cautiverio, ya que los estudios anteriores se han enfocado a animales de vida libre. Los altos porcentajes de animales infectados con Trichinella encontrados en este estudio permiten concluir que los animales de zoológico son reservorios importantes de la enfermedad.

Esta parasitosis podría tratar de controlarse intentando el control de fauna nociva dentro del zoológico y mediante la inspección de la carne que se utiliza como alimento.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se concluye que:

La infección por Trichinella se encuentra presente en el Zoológico de Chapultepec.

Los resultados de los ensayos de ELISA sugieren que para evitar falsos positivos por reacciones cruzadas con otros parásitos se deben utilizar antígenos purificados de secreción-excreción o de superficie/esticosoma.

Los resultados obtenidos en inmunoelctrotransferencia evidenciaron el reconocimiento de antígenos inmunodominantes de las dos especies de Trichinella y a su vez permitió confirmar los resultados del ELISA por lo que se sugiere que se realicen ambas pruebas para determinar la presencia del parásito en los animales.

La osa en que se encontraron larvas musculares de T. nativa como los otros animales que se encontraron positivos a Trichinella en pruebas serológicas, pudieron infectarse en el Zoológico de Chapultepec puesto que el 82% de los animales estudiados nacieron en cautiverio o fueron traídos al Zoológico de Chapultepec a una edad muy temprana.

Las fuentes de infección para los animales determinados como positivos pueden haber sido la carne de caballo con que se alimentan o las ratas que se encuentran en el zoológico como fauna nociva del mismo.

SUGERENCIAS

Se recomienda realizar digestión artificial de muestras de diafragma y lengua de caballos con los que se alimentan todos los cánidos y félidos, así como captura y digestión artificial de ratas para así poder detectar el origen del problema.

Para el control de la parasitosis se recomienda intentar el control de la fauna nociva dentro del zoológico, así como realizar la inspección por triquinoscopia de la carne de caballo que se utiliza para alimentar a estos animales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Acha, P.V.: Triquinosis en "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales", 2a. edición, Edit. Panamericana de la Salud, 867, 869, 876-877. (1986).
- 2.- Adame G.J.: "Determinación de la viabilidad de Trichinella spiralis en diferentes organos del cerdo", Tesis profesional. F.M.V.Z. de la U.N.A.M., 7-9, 21. (1981).
- 3.- Ajenjo, C.: "Enciclopedia de la inspección veterinaria y analisis de alimentos" Edit. Espasa-Calpe, España, 55,500, (1980).
- 4.- Ancelle, T.; J. Dupouy-Camet; M.E. Bougnoux; V. Fourestie; H. Petit; G. Mougeot; J.P. Nozais and J. Lapiere: "Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985", American Journal of Epidemiology 127, 1302-1211. (1988).
- 5.- Arriaga, C.; Muñiz, E.; Morilla, A.; Ortega-Pierres, M.G.: "Evaluation of purified surface stichosomal components of Trichinella spiralis muscle larvae for diagnosis of swine Trichinellosis", en: Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis, C. E. Tanner, A. Martínez-Fernández and F. Bolas (Ed.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España, 182-187. (1988).
- 6.- Arriaga, C.; Muñiz, E., Morilla, A. and Ortega-Pierres, G.: "Trichinella spiralis: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis", Experimental Parasitology 62, 363-372. (1989).
- 7.- Arriaga, C.: "Inmunodiagnóstico de la Triquinosis en cerdos", Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre, Edit. U.N.A.M., 722-744, (1991).
- 8.- Arriaga, C.; Salinas-Tobon, R.; Morilla, A y Ortega-Pierres, G.: "Use of purified surface/stichosomal antigens of Trichinella spiralis muscle larva in the detection of naturally infected swine". Research and Reviews in Parasitology, 51, 103-105. (1991).

9.- Arriaga, C.; Morilla, A.; Ortega-Pierres, G.: "Nuevos métodos para el diagnóstico de la Trichinosis porcina", en: Avances en Producción Porcina, Vol. I, A. Morilla (Ed.). Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C., Madrid, 319-322. (1992).

10.- Bessonov, A.S.: "Trichinellosis in the USSR in 1979-1983", en: Trichinellosis. Proceedings of the Sixth International Conference on Trichinellosis, C. W. Kim (Ed.). The State University of New York Press, Albany, New York, 226-262. (1984).

11.- Borchert, A.: "Trichinella en: Parasitología veterinaria", Edit. Acribia, 401-414. (1975).

12.- Brglez, J.: "The incidence of Trichinellosis in some wild animals in Yugoslavia", en: Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis, C. E. Tanner, A. Martínez-Fernández and F. Bolas (Ed.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España, 412-412. (1988).

13.- Campbell, W.C.: "Trichinella and Trichinosis", Merck Institute for Therapeutic Research, 367-387, 422-443 y 446-488. (1983).

14.- Chan, S.W. and R.C. Ko: "Serodiagnosis of human trichinosis using a gel filtration antigen and indirect IgG-ELISA", Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 84, 721-722. (1990).

15.- Cowen, P.; Li, S.; McGinn, T.: "Survey of trichinosis in breeding and cull swine, using an enzyme-linked immunosorbent assay", American Journal Veterinary Research, 51, 924-928. (1990).

16.- Cowen, P.; Pacer, R.A.; Van Peteghem, P.N.; Fetrow, J.F.: "Management factors affecting trichinosis seropositivity among 91 North Carolina swine farms", Preventive Veterinary Medicine, 9, 165-172. (1990).

17.- Dennis, D.T.; Despommier, D.D.; Davis, N.: "Infectivity of the new born larvae of Trichinella spiralis in the rat", Journal of Parasitology, 56, 974. (1970).

- 18.- Despommier, D.: "Biología de la fase parenteral de la *Trichinella spiralis*" En: Congreso Nacional de Parasitología, Sociedad mexicana de Parasitología, 396. (1990).
- 19.- Dolley, J.R.; Grieve, P.A.: "A simple technique for eliminating interference by detergents in de Lowry method of protein determination", Anal. Biochem. **64**, 136-141. (1975).
- 20.- Dupouy-Camet J.; Soulé Cl. and Ancelle T.: "Recent news on trichinellosis: another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993" Parasite, **1**, 99-103. (1994).
- 21.- Fauna, Enciclopedia Salvat de la, Edic. Salvat Vol. 13, 264-266, 271-272. (1979).
- 22.- Fowler, M.E.: "Cap. Carnivores en Fowler Zoo & Wild Animal Medicine", 2^a ed., Edic. Morris Animal Foundation, 813, 837 y 960. (1986).
- 23.- Franchimont, J.H.; F. van Knapen; A.F.T. Kremers: "Trichinellosis in wild life in the Netherlands" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.), Instituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 561-564. (1994).
- 24.- Gamble, H.R.; Anderson, W.R.; Graham, C.E.; Murrell, K.D.: "Diagnosis of swine Trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen", Veterinary Parasitology, **13**, 349-361. (1983).
- 25.- Gamble, H.R.; Graham, B.S.: "Comparison of monoclonal antibody-based competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of swine trichinosis", Veterinary Immunology and Immunopathology, **6**, 379-389. (1984).
- 26.- Gamble, H.R.; Graham, B.S.: "Monoclonal antibody-purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis", American Journal Veterinary Research Vol. 45, 67-74. (1984).
- 27.- Gould, S.E.: "Trichinosis in man and animals", Publisher Charles C. Thomas, 19-27, 361-369, 451-454, 480-487. (1970).

28.- Haralabidis, S.T.; Frydas, S.I.; Himonas, C.A.: "Latex agglutination test for detecting Trichinella spiralis infections in pigs using muscle extract", Veterinary Parasitology, **34**, 191-201. (1989).

29.- Henriksen, Sv.Aa.; E.W. Born; L. Eiersted: "Infections with Trichinella in polar bears (Ursus maritimus) in Greenland: prevalence according to age and sex" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.). Instituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 565-568. (1994).

30.- Herrera R.D.: "Diagnóstico de las parasitosis internas de los rumiantes domésticos y cerdos", Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, **204**. (1985).

31.- Hoberg, E.P.; Aubry, K.B.; Brittell, J.D.: "Helminth parasitism in martens (Martes americana) and ermines (Mustela erminea) from Washington, with comments on the distribution of Trichinella spiralis", Journal of Wildlife Diseases, **26**, 447-452. (1990).

32.- Ivanoska, D.; Cuperlovic, K.; Lunney, J.K.: "Peripheral blood mononuclear cell subsets during Trichinella spiralis infection in pigs", Research in Veterinary Science, **49**, 92-97. (1990).

33.- Kasacos, K.R.; Little A; Rowe F.; Wade W.; Gaffar S.: "A tongue biopsy technique, for the detection of trichinosis in swine", Veterinary Parasitology, **19**, 151-156. (1986).

34.- Kovac P.A. y Ramos F.G.: "Zoología, medicina preventiva y clínica de los mamíferos y aves de zoológico", Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M., 125-134. (1985).

35.- La Rosa, G.; Pozio, E.; Rossi, P.; Murrell, K.D.: "Allozyme analysis of Trichinella isolates from various host species and geographical regions", Journal Parasitology, **74**, 641-646. (1992).

36.- Leiby, D.A.; Schad, G.A.; Duffy, Ch.H.; Murrell, K.D.: "Trichinella spiralis in an agricultural ecosystem. III. Epidemiological investigations of Trichinella spiralis in resident wild and feral animals", Journal Parasitology, 606-609. (1988).

37.- Libby, J.: "Higiene de la carne". Edit. CECSA, 199, 209-213. (1981).

38.- Marinculic, A.; Gamble, H.R.; Urban, J.F.; Rapic, D.; Zivicjak, T.; Smith, H.J.; Murrell, K.D.: "Immunity in swine inoculated with larvae or extracts of a pig isolate and a sylvatic isolate of Trichinella spiralis", American Journal Veterinary Research, 52, 754-758. (1991).

39.- Martínez C.A. y Estrada N.M.: "Evolución socioeconómica y técnica de la incidencia de Trichinella spiralis en los cerdos sacrificados en los rastros del Valle de Cuautitlán Texcoco, Edo. de México, durante el periodo comprendido entre Diciembre de 1987 y Mayo de 1988", Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M., 40-44. (1990).

40.- Martínez L.P.: "Apuntes de la Materia de Parasitología Veterinaria", FES-Cuautitlán. (1988).

41.- Medina G.L.: "Reactividad de sueros de cerdo ante un antígeno de Trichinella spiralis con dos pruebas serológicas", Tesis profesional. F.M.V.Z. de la U.N.A.M., 2-3, 9-15. (1977).

42.- Merck de Veterinaria, El Manual, 3ª ed., Edit. Merck & Co. Inc., 400-402. (1988).

43.- Moreno G.M. y Muñoz E.J.: "Características de la respuesta inmune en Trichinella spiralis" Investigación Científica, vol. I, #5, 17-27. (1993).

44.- Mundo Animal, Atlas del, 6ª ed. Edit. Selecciones del Reader's Digest, 373-372 y 418-419. (1988).

45.- Murrell, K.D.; Anderson, W.R.; Schad, G.A. et al.: "Field evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis: Efficacy of the excretory-secretory antigen", American Journal of Veterinary Research, 47, 1046-1049. (1986).

46.- Murrell, K.D., et al: "Trichinella spiralis in an agricultural ecosystem. II. Evidence for natural transmission of Trichinella spiralis spiralis from domestic swine to wildlife", The Journal of Parasitology, Vol. 73, 103-109. (1987).

47.- Ortega-Pierres, G.; Muñiz, E.; Coral-Vazquez, R. and Parkhouse, R.M.E.: "Protection against Trichinella spiralis induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae". Parasitology research, 75, 563-567. (1989).

48.- Ortega P.; Salinas T.; Morilla A.; Gallegos C.; Arriaga C.: "Diagnóstico de triquinosis porcina empleando antígenos purificados de larva muscular de Trichinella spiralis". En Congreso Nacional de Parasitología, 9. Sociedad Mexicana de Parasitología A.C., 405. (1990).

49.- Parkhouse, R.M.E.; Phillip, M.; Ogilvie, B.M.: "Characterization of surface antigens of Trichinella spiralis infective larvae". Parasite immunology, 3, 339-352. (1981).

50.- Peña P.A.; Bautista, C. y Castilla, M.: "Comparación de la prueba de inmunoensayo en capa delgada (ICD) con la técnica de Hemoaglutinación Pasiva (HP) para la detección de anticuerpos anti-Trichinella spiralis en roedores". Veterinaria México, 19, 321-327. (1988).

51.- Pozio, E.; La Rosa, G.; Rossi, P.: "Trichinella reference centre". Parasitology Today, 5, 169-170. (1989).

52.- Pozio, E.; La Rosa, G.; Murrell, K.D.; Lichtenfels, J.R.: "Taxonomic revision of the genus Trichinella". Journal of Parasitology, 654-659. (1992).

53.- Pozio, E.; La Rosa, G.; Rossi, P.; Murrell, K.D.: "Biological characterization of Trichinella isolates from various host species and geographical regions". Journal of Parasitology, 647-653. (1992).

54.- Quiroz R.H.: "Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos". Editorial Limusa, 386, 390, 574-581. (1984).

55.- Ramírez V.M.: "Avances en enfermedades del cerdo", Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 557-566. (1985).

- 56.- Rausch, R.L.: "Observations on some natural-focal zoonoses in Alaska". Arch Environ Health, **22**, 246-222. (1972).
- 57.- Reina, D; Habela, M.; Navarrete, I.; Martínez G.F.: "Hypoglycaemia in experimental canine trichinellosis", Veterinary Parasitology, **30**, 289-296. (1989).
- 58.- Rice, L; Fongillo, M.K.; Randolph, J.F.: "Trichinosis in a dog". JAVMA, **197**, 490-482. (1990).
- 59.- Rossi, L; T. Balbo: "Habitat related differences in the prevalence of vulpine trichinellosis in NW Italy" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.). Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 575-579. (1994).
- 60.- Ruitenberg, E.J.; Steerenberg, P.A.; Brossi, B.J.M.; Buys, J.: "Serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in pigs by enzyme linked immunosorbent assay", Bulletin W.H.O., **51**, 108-109. (1974).
- 61.- Ruitenberg, E.J.; Steerenberg, P.A.; Brossi, B.J.M.; Buys, J.: "Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of Trichinella spiralis infections in conventionally raised pigs", Journal of Immunological Methods, **10**, 67-83. (1976).
- 62.- Ruitenberg,E.J.: "The parasite and his students", en: Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis, C. E. Tanner, A. Martínez-Fernández and F. Bolas (Ed.). Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España, 1-12. (1988).
- 63.- Ruiz G.M.: "Incidencia de triquinosis en cerdos sacrificados en el rastro de Morelia Michoacan en un periodo de 6 meses y su importancia en salud pública", Tesis profesional Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 27-38, 63-95. (1992).
- 64.- Saiz M.L.: "Las zoonosis", Editorial AEDOS, Barcelona, España, 270-282. (1976).

65.- Salazar, S.; Hara A.: "Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de la parasitosis", Francisco Méndez Editor, México, 58. (1986).

66.- Salinas T.M.R.; c. Valdez Cruz, M.R. Chapa Ruiz; M.G. Ortega Pierres: "Longitudinal analysis of the human response to Trichinella spiralis antigens by ELISA and Western blot assays" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.). Instituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 373-379. (1994).

67.- Scaramozzino, P.; R. Fico; M. Scacchia; L.M. Brugnola; G. La Rosa: "Wildlife trichinellosis in the Abruzzo region (Italy)" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.). Instituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 581-584. (1994).

68.- Seawright, G.L.; Despommier, D.D.; Zimmerman, W.; Isenstein, R.S.: "Enzyme immunoassay for swine trichinellosis using antigens purified by immunoaffinity chromatography", American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 32, 1275-1284. (1983).

69.- Smith, H.J.: "Factors affecting preconditioning of Trichinella spiralis nativa larvae in musculature to low temperatures", Canadian Journal Veterinary Research, 51, 169-173. (1987).

70.- Smith, H.J.; Snowdon, K.E.: "Sylvatic Trichinosis in Canada", Canadian Journal Veterinary Research, 22, 488-489. (1988).

71.- Smith, H.J.; Snowdon, K.E.: "Comparative assessment of a double antibody enzyme immunoassay test kit and a triple antibody enzyme immunoassay for the diagnosis of Trichinella spiralis spiralis and Trichinella spiralis nativa infections in swine", Canadian Journal Veterinary Research, 53, 497-499. (1989).

72.- Smith, H.J.; Snowdon, K.E., Finley, G.G.: "Eosinophilic myositis in canadian cattle", Canadian Journal Veterinary Research, 55, 94-95. (1991).

73.- Soulsby, E.S.L.: "Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos", Edit. Interamericana, 330-333. (1988).

74.- Stancampiano, L.; V. Guberti; F. Francisci; M. Magi; C. Bandi: "Trichinellosis in wolf (Canis lupus) in Italy" en: Trichinellosis. Proceedings of the Eight International Conference on Trichinellosis, E. Pozio and F. Bruschi (Ed.). Instituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 585-589. (1994).

75.- Sue and Prestcott: "A dot ELISA mimicry Western blot test corthe detection of swine Trichinellosis", Journal Parasitology, 77, 76-82. (1991).

76.- Tizard, I.: "Inmunología veterinaria", Editorial Interamericana, 143-144. (1985).

77.- Van Knapen, F.; Franchimont, J.H.; Ruitenberg, E.J.; Baldelli, J.: "Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of Trichinella spiralis infections in pigs". Veterinary Parasitology, 7, 109-121. (1980).

78.- Van Knapen, F., et al: "Comparison of four methods for early detection of perimental Trichinella spiralis infections in pigs", Veterinary Parasitology, 9, 117-123. (1981).

79.- Vega A.N.; Fernández S.: "Triquinelosis porcina" en: Zoonosis parasitarias. Ponencias Coordinación de cursos de actualización UNAM-FMVZ, 427-432. (1986).

80.- Velázquez N.M.A.: "Diagnóstico serológico de la Trichinella spiralis en cerdos del Municipio de Paracho, Michoacán mediante el empleo del ensayo de ELISA", Tesis profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 8-16 y 28-32. (1986).

81.- Villar C.R.C.: "Estudio Triquinoscópico de cerdos sacrificados en el rastro Periférico Sur del D.F.", Tesis profesional. F.M.V.Z. de la U.N.A.M., 17-24. (1984).

82.- Wagner, J.A. and Frank, W.: "Recent research on the prevalence of Trichinella in wild mammals in the Federal Republic of Germany", en: Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis, C. E. Tanner, A. Martínez-Fernández and F. Bolas (Ed.), Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, España, 416-422. (1988).

83.- Yopez M.L.: "Inmunología de Trichinella spiralis". Examen predoctoral, Instituto Politécnico Nacional, 16-28. (1991).

84.- Zaman, V.: "Atlas de parasitología clínica", Editorial Médica Panamericana S.A., 195-198, 237. (1984).