



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

EVALUACION DEL ANTIGENO DE EXCRECION-SECRECION  
DE LARVAS INFECTIVAS DE *T. spiralis* MEDIANTE LA  
TECNICA DE DOT-ELISA EN COMPARACION CON LA  
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) PARA EL  
SERODIAGNOSTICO DE LA TRIQUINOSIS PORCINA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A N :  
JULIA ROJAS RETIZ  
MARIO ENRIQUE DE NOVA ROSAS



MEXICO, D. F.

ENERO 1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

**EL PRESENTE PROYECTO DE INVESTIGACION SE REALIZO EN EL  
LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE  
PARASITOLOGIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BAJO LA DIRECCION DE LA Q.B.P. BLANCA ROSA AGUILAR FIGUEROA Y LA  
Q.F.B. ARACELI GARCIA DEL VALLE.  
PROYECTO No. 942464 FINANCIADO POR DEPI**

**EVALUACION DEL ANTIGENO DE EXCRECION-SECRECION DE LARVAS  
INFECTIVAS DE *T. spiralis* MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA EN  
COMPARACION CON LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET) PARA EL  
SERODIAGNOSTICO DE LA TRIQUINOSIS PORCINA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en especial a la Facultad de Estudios Superiores (FES) Zaragoza.**

**Por habernos acogido en sus aulas y brindarnos los conocimientos que hemos adquirido para nuestra formación profesional.**

**A quienes conformaron el jurado de tesis, por sus valiosos comentarios en la revisión de este escrito:**

- **Dr. Ruben Marroquín Segura**
- **Q.B.P. Blanca Rosa Aguilar Figueroa**
- **Q.F.B. Araceli García Del Valle**
- **Q.F.B. Patricia Vidal Millán**
- **Q.F.B. José Oscar González Moreno**

**Al M. en C. Mario Escartón de la Universidad Nacional Autónoma de Aguascalientes**

**Dra. Camila Arriaga del CENID, Lab. de Microbiología, INIFAP**

**Dra. Guadalupe Ortega del CINVESTAV**

**Dr. Rafael Olca del CEIEPP, UNAM**

**Dr. Alejandro Padilla Trejo, Biomédicas, UNAM**

**Por sus facilidades otorgadas para la realización del presente estudio.**

**A los profesores :**

**Q.B.P. Olga Ixta Rodríguez**

**M. en C. Federico Martínez Gómez**

**M. en C. Benjamín Noguera Torres**

**Dr. Rosario Salinas Tobón**

**Q.B.P. Judith Estebes Ramírez**

**Les agradecemos por todas sus aportaciones y asesoría durante este proyecto de investigación.**

## **INDICE**

	<b>PAGINA</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>37</b>
<b>METODOLOGIA GENERAL</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>88</b>

## TABLAS

No.	TABLA	PAGINA
1	ESPECIES DEL GENERO <i>Trichinella</i>	5
2	CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE TRIQUINOSIS	21
3	PATRON DE REACTIVIDAD DE ANTICUERPOS MONOCLONALES HACIA DIFERENTES FRACCIONES DE <i>T. spiralis</i> ANALIZADAS POR IET	24
4	PESO MOLECULAR (KDa) DE LOS COMPONENTES DEL ANTIGENO DE E/S RECONOCIDOS POR SUEROS POSITIVOS A <i>T. spiralis</i>	59
5	DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI- <i>T. spiralis</i> EN CERDOS INFECTADOS MEDIANTE LAS TECNICAS DE IET Y DOT-ELISA	77
6	CONTINGENCIA ESTADISTICA	78
7	DETERMINACION DE PARAMETROS ESTADISTICOS	79

## FIGURAS

No.	FIGURA	PAGINA
1	ADULTO MACHO DE <i>T. spiralis</i>	8
2	ADULTO HEMBRA DE <i>T. spiralis</i>	9
3	FASE ENTERAL DEL CICLO DE VIDA DE <i>T. spiralis</i>	11
4	FASE PARENTERAL DEL CICLO DE VIDA DE <i>T. spiralis</i>	14
5	CICLO SINANTROPICO DE TRANSMISION	16
6	CICLO SILVESTRE DE TRANSMISION	17
7	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 1 MEDIANTE LA TECNICA DE IET	62
8	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 2 MEDIANTE LA TECNICA DE IET	63
9	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 3 MEDIANTE LA TECNICA DE IET	64
10	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON <i>A. suum</i> , MEDIANTE LA TECNICA DE IET	65
11	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 1 MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	66
12	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 2 MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	67
13	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR EL CERDO No. 3 MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	68
14	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR SUEROS DE CERDOS DE TRASPATIO DE JESUS MARIA, AGUASCALIENTES, MEDIANTE LA TECNICA DE IET	69
15	RECONOCIMIENTO DEL Ag DE E/S DE <i>T. spiralis</i> POR SUEROS DE CERDOS DE TRASPATIO DE JILOTEPEC, EDO. DE MEXICO, MEDIANTE LA TECNICA DE IET	70



No.	FIGURA	PAGINA
16	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR SUERO DE CERDOS DE TRASPATIO DE JESUS MARIA, AGUASCALIENTES, MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	71
17	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR SUEROS DE CERDOS DE TRASPATIO DE JILOTEPEC, EDO. DE MEXICO, MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	72
18	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>T. spiralis</i> POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON <i>A. suum</i> , MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	73
19	RECONOCIMIENTO DEL Ag SOMATICO DE <i>A. suum</i> POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON <i>A. suum</i> , MEDIANTE LA TECNICA DE IET	74
20	IDENTIFICACION DE Abs anti- <i>A. suum</i> POR SUEROS DE CERDOS INFECTADOS NATURALMENTE CON <i>A. suum</i> , MEDIANTE LA TECNICA DE DOT-ELISA	75
21	PRUEBAS DE CONTROL EN LA TECNICA DE IET	80
22	PRUEBAS DE CONTROL EN LA TECNICA DE DOT-ELISA	81

# INTRODUCCION

A pesar de las normas establecidas y los programas de control sanitario que se llevan a cabo, continúan presentándose brotes de triquinosis en distintas partes del mundo, incluyendo México donde la frecuencia de estos brotes parece haberse incrementado en los últimos años. (Martínez-Marañón, 1985).

Este aparente aumento de la triquinosis en el país es explicable si se considera que en la mayoría de los rastros no se cuenta con el equipo necesario para realizar un análisis microscópico de la carne de los animales sacrificados además de que un alto porcentaje de la carne de cerdo que se consume en el país procede de matanza no controlada ( Ramírez-Valenzuela, 1985).

La detección de animales infectados se hace utilizando métodos como la triquinoscopia o la digestión artificial, en los que se demuestra directamente la presencia de larvas en los tejidos. Sin embargo, estos métodos son costosos y laboriosos; además, infecciones leves o tempranas pasan desapercibidas debido a que la sensibilidad de estas pruebas no es adecuada. (Knapen y cols., 1980).

Es por ello que se han tratado de desarrollar pruebas inmunológicas sensibles y específicas para el diagnóstico de triquinosis porcina. Diversas pruebas serológicas como fijación del complemento, hemaglutinación pasiva, aglutinación en látex e inmunofluorescencia indirecta han sido implementadas para el diagnóstico de la triquinosis porcina y humana.

Por otro lado, en los últimos años los ensayos inmunoenzimáticos, como el ELISA, han desplazado a muchas de las otras pruebas debido principalmente a su alta sensibilidad y facilidad de ejecución que permite examinar gran número de muestras en corto tiempo.

Los primeros en utilizar el ELISA para el diagnóstico de la triquinosis en cerdos fueron Ruitenbergh y cols. ( Knapen y cols.,1985; Ruitenbergh y cols. al.,1985), quienes demostraron que este ensayo era más sensible que la inmunofluorescencia y la detección directa del parásito.

Sin embargo, uno de los problemas encontrados fue el elevado número de falsos positivos ( Ruitenbergh y cols.,1976) el cual podía ser atribuido en parte a la utilización de antígenos crudos ya que hay epítomos compartidos entre *T. spiralis* y otros parásitos comunes en los cerdos como *Ascaris suum* o *Trichuris suis* .(Gamble,1984).

La especificidad de la prueba de ELISA se ha incrementado al utilizar antígenos más purificados como el utilizado por Seawright et. al. ( Seawright y cols.,1983) y el antígeno de excreciones y secreciones de Gamble y cols. ( Gamble y cols.,1983).

Puesto que la utilización de pruebas como el ELISA en los rastros del país no es factible ya que no se cuenta con el equipo necesario, actualmente se están desarrollando otras modalidades de ensayos inmunoenzimáticos como el DOT-ELISA ( Papas y cols.,1984), de fácil aplicación en el campo y en los rastros ya que se puede leer visualmente. La prueba

también fue evaluada por Su y Prestwood ( Su y Prestwood, 1991) quienes encontraron que mostraba una sensibilidad y especificidad semejante al ELISA e Inmunoelectrotransferencia.

Al igual que Su y Pretswood varios investigadores han implementado la técnica de DOT-ELISA para el diagnóstico de enfermedades como esquistosomiasis crónica y aguda, la enfermedad hidatídica quística y leishmaniasis visceral humana; en las cuales se ha demostrado la eficiencia de la técnica, obteniéndose una sensibilidad mayor al 90% en todas ellas.

En este contexto, el estudio de la implementación de la técnica de DOT-ELISA para el diagnóstico de la triquinosis porcina resulta de gran interés; ya que la utilización de esta prueba en muestreos serológicos en todos los estados de la República permitiría la identificación de zonas endémicas del parásito, lo que contribuiría al control de la triquinosis humana.

# **ANTECEDENTES**

## **HISTORIA**

La *Trichinella spiralis* fue descubierta como larva enquistada en los músculos de cadáveres humanos a los cuales se les realizó la autopsia en Londres por Peacock en 1828, por Hilton en 1833 y Paget en 1835. Richard Owen en 1835 fue quién primero describió y nombró las larvas enquistadas. (Campbell, 1979; Chester, 1990)

Von Siebold (1844) y Durjan (1845) sospecharon que el parásito era el estado larvario de un nemátodo. Joseph Leidy (1846) en Filadelfia, encontró los quistes en la carne de cerdo e hizo notar su semejanza con los hallados en el hombre. Las investigaciones de Leuckart (1853-1860) y de Virchow (1858-1860) demostraron que estos quistes se convierten en gusanos adultos en pocos días cuando se administran a ciertos animales de experimentación. (Chester, 1990)

En México, la triquinosis fue descubierta por primera vez en 1891 por el doctor Manuel Toussaint, en un trozo de tejido muscular que le llevó el Dr. Miguel Zúñiga preparador de la clase de Anatomía, a quién en varias ocasiones había llamado la atención el puntilleo blanquecino que presentaban los músculos en algunos cadáveres humanos. (Barragan, 1893)

En México, aunque se tienen antecedentes del padecimiento desde 1944, cuando Mazzotti estudió 1000 diafragmas obtenidos de cadáveres en el Hospital General de México, la enfermedad fue descrita por primera vez en 1975 por los doctores Sergio Rodríguez y José Manuel Gallardo Hernández al diagnosticarla en un paciente en el Hospital General de Zacatecas en el año 1944. (Fragoso, 1985)

## **CLASIFICACIÓN.**

Clasificación taxonómica según Despommier, 1987.

Reino: Animal

Phylum: Nematoda

Clase: Aphasmida

Orden: Trichurata

**Familia:** Trichinellidae

**Género:** Trichinella

**Especie:** spiralis

Por más de 100 años se creía que la triquinosis era causada por la *T. spiralis* solamente, sin embargo, evidencias biológicas y fenotípicas suponen la existencia de varias cepas, subespecies o especies. (Lichtenfels, 1983)

Por muchos años la designación de especies de *Trichinella* se realizó por sus características biológicas y su localización geográfica; sin embargo, en la década de los 80's se identificaron varias especies de *Trichinella* mediante el análisis de DNA. A partir de la comparación de patrones isoenzimáticos se puso de manifiesto que hay cuando menos siete especies diferentes distribuidas en todo el mundo, de las cuales cinco infectan al hombre. En esta designación *T. spiralis* fue determinada T1, *T. nativa* T2, *T. nelsoni* T7, *T. pseudospiralis* T4 y *T. britovi* T3; T5 y T6 fueron determinadas como distintos a las otras cinco especies. (Yépez-Muliá, 1994)

De las cinco especies de *Trichinella* caracterizadas se realizó un análisis genético, bioquímico y biológico de aproximadamente 300 triquinelas, resumiéndose los resultados en la Tabla 1.

## **DEFINICIÓN**

La triquinosis es una enfermedad parasitaria producida por *Trichinella spiralis* y adquirida por el hombre al ingerir carne de cerdo contaminada o sus productos crudos o mal cocidos. Es una de las zoonosis parasitarias de mayor importancia a nivel médico y veterinario, siendo de distribución cosmopolita. (Domínguez, 1992)

Desde el punto de vista clínico, la triquinosis se manifiesta como una enfermedad tóxica infecciosa aguda, grave e inespecífica. (Hernández, 1992)

La triquinosis es una infección intestinal y tisular del hombre y otros mamíferos causada por el nemátodo *Trichinella spiralis*. (Yépez-Muliá, 1994)

**TABLA I**

**ESPECIES DEL GENERO *Trichinella***

Especie	Ubicación Geográfica	Producción de larvas recién nacidas in vitro (NBL)	Tiempo de desarrollo de la célula nodriza	Índice de capacidad de reproducción (RCI) en ratones, ratas y puercos	Resistencia al frío	Presencia de aloenzimas	Patogenicidad en humanos
<i>T. britovi</i>	Región Paleártica	35-55/72 hrs	24 hrs a 4 días PI	Baja	Baja	1	Moderada
<i>T. nativa</i>	Región Holártica	28-54/72 hrs	20-30 días PI	Baja	Alta	2	Moderada
<i>T. spiralis</i>	Cosmopolita	Alta > de 90/72 hrs	16-37 días PI	Alta	Sensible	6	Alta
<i>T. pseudospiralis</i>	Cosmopolita	35-60/72 hrs	Ausencia de cápsula	Alta en ratón y rata. Baja en cerdo	Sensible	12	Desconocida
<i>T. nelsoni</i>	África ecuatorial	49-90/72 hrs	34-60 días PI	Baja	Sensible	4	Moderada



## MORFOLOGÍA

Los nemátodos son gusanos cilíndricos, alargados, con simetría bilateral; la mayoría de los nemátodos son dióicos, esto es, poseen los sexos separados; las hembras suelen ser de mayor tamaño que los machos, y viven más tiempo que éstos.

Según su localización en el huésped, se dividen en nemátodos hemohísticos y nemátodos intestinales, destacando a *Trichinella spiralis* y a las filarias entre los primeros. (Bada, 1986)

*Trichinella spiralis* es el parásito nemátodo filiforme causante de la enfermedad conocida como triquinosis. (Yépez-Muliá, 1994; Ancha, 1989)

En ambos sexos, la parte anterior del cuerpo esta ocupada en gran medida por el esticosoma, un cordón compacto de células glanduloriformes dispuestas linealmente y llamadas esticocitos. (Chester, 1990)

El esticosoma es un órgano compuesto de aproximadamente 50 células apiladas; 35-40 son designadas como gránulos  $\beta$  o beta-esticocitos y 10-15 células llamadas gránulos  $\alpha$  o alfa-esticocitos que se localizan en la región anterior del esticosoma. Muchos de los antígenos secretados por el gusano son sintetizados en estos gránulos. Las larvas recién nacidas no contienen un esticosoma o la característica secretora de antígenos el cual empieza a formarse después de invadir las células del músculo estriado. (Despommier, 1990; Silberstein, 1984; Yépez-Muliá, 1994)

Por delante del esticosoma, se localiza el esófago, que es muscular; el cual se extiende a lo largo del gusano y que de algún modo está situado en el esticosoma, el esófago es extraordinariamente estrecho; por detrás del esticosoma se une al intestino, que es un tubo simple relativamente delgado, que se extiende hasta el ano o cloaca. En ambos sexos, la boca lleva un estilete. Wright en 1979 demostró por microfotografía electrónica que, al moverse de un sitio a otro, los gusanos atraviesan las células del epitelio mucoso y pasan también entre ellas. Así pues, *T. spiralis*, gracias al tamaño y a la forma de su cuerpo y a sus estructuras bucales, se adapta bien a la vida en el epitelio mucoso de las criptas y vellosidades. (Chester, 1990)

Los gusanos adultos son diminutos y filiformes. Los machos miden aproximadamente 1.2 mm de longitud por 60  $\mu\text{m}$  de diámetro. El extremo anterior es relativamente delgado con papilas cefálicas y otras estructuras que sólo pueden apreciarse al microscopio electrónico. La extremidad posterior lleva un par de papilas cónicas visibles, una a cada lado del orificio cloacal. Un testículo simple que esta situado a corta distancia del extremo posterior del cuerpo y se extiende hacia delante hasta aproximadamente la mitad del cuerpo, donde se une al tubo genital, que a su vez se extiende en sentido posterior hasta la cloaca. (Chester, 1990)

Las hembras adultas miden de 2 a 3.6 mm de longitud por 75 a 90  $\mu\text{m}$  de ancho, casi el doble de longitud y una y media veces el ancho del macho. Un ovario único se sitúa en la parte posterior del cuerpo con el oviducto, el receptáculo seminal, el útero y la vagina formando un canal casi recto hasta la vulva, que está situada en la cara ventral del cuerpo a una distancia del extremo anterior de aproximadamente una cuarta parte de su longitud (Figura 1 y 2). (Chester, 1990)

Luego de la copulación, los huevecillos son depositados en el útero de la hembra, con cerca de 1500 larvas vivas que produce cada hembra en un huésped no inmune. (Goldsmith, 1995)

En el sexto día de infección comienzan a aparecer larvas móviles de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de longitud y 6  $\mu\text{m}$  de anchura. La larva tiene una punta lanceolar en su extremidad anterior y al penetrar las fibras musculares alcanza un tamaño de 900 a 1300 por 35 a 40  $\mu\text{m}$ . La larvificación continúa durante un período aproximado de 4 semanas. (Chester, 1990; Harold, 1985)

## CICLO BIOLÓGICO

*T. spiralis* es un parásito intracelular tanto en el estado de larva como en adulto. La larva del primer estadio vive en una porción modificada de las células del músculo esquelético; la célula nodriza. (Despommier, 1993)

Esta unidad infecciosa puede sobrevivir en algunos hospederos durante la vida del animal (ratón y rata). En otros como el humano, esta eventualmente se calcifica y, el parásito y la célula nodriza mueren. (Yépez-Muliá, 1994; Despommier, 1990)

Los gusanos adultos ocupan una porción en el epitelio columnar del intestino, viviendo como un parásito intramulticelular. La larva recién nacida es la única que no es intracelular, ya que vive en la circulación sanguínea. (Despommier, 1993)

El ciclo biológico de *T. spiralis* tiene una característica que lo hace diferente de los otros parásitos, ya que todo él tiene lugar en el mismo individuo que sirve de huésped del parásito. (Bada, 1986)

*T. spiralis* es uno de los parásitos intracelulares más grandes del mundo. A diferencia de otros organismos, este no mata la célula del huésped, pero induce modificaciones en la estructura celular para aumentar su propia sobrevivencia. (Despommier, 1990)

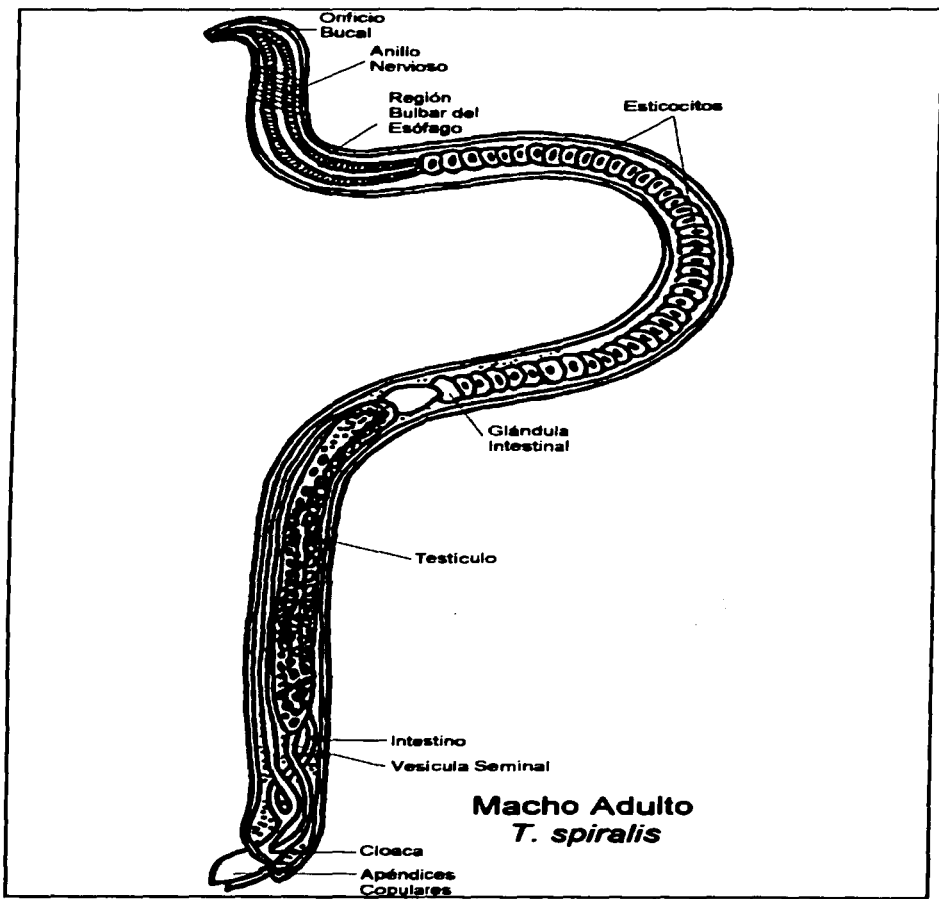


FIGURA 1  
FUENTE: Soulé, 1993  
8

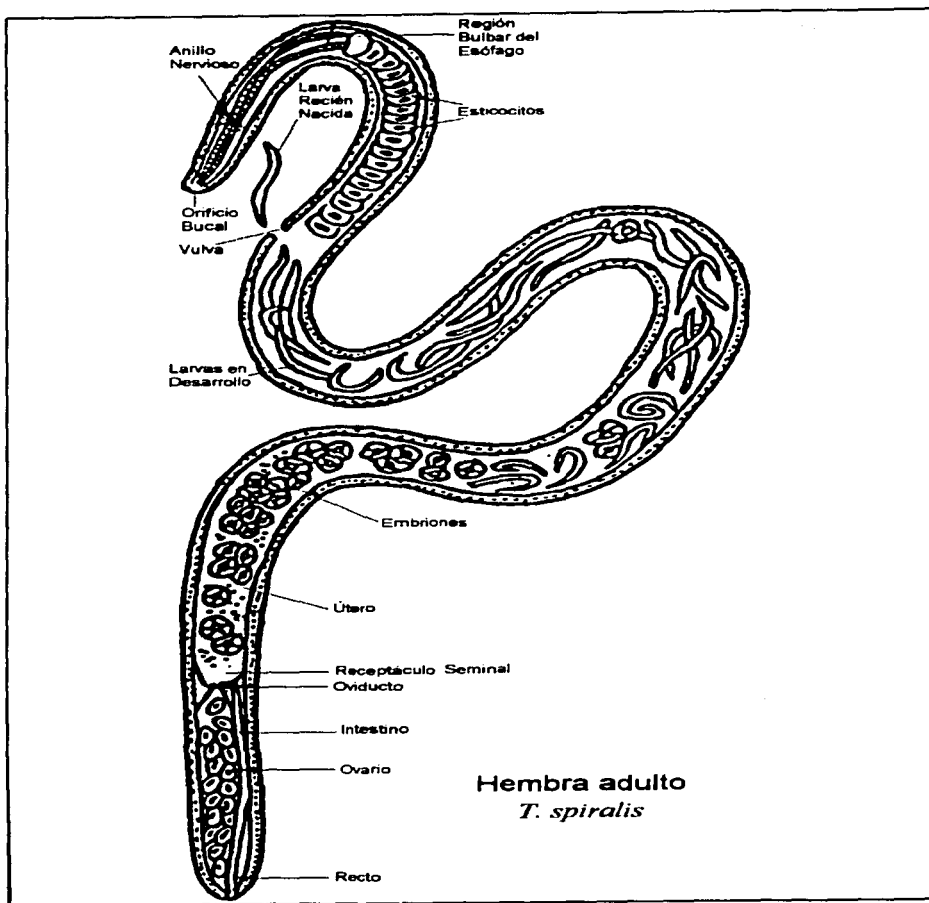


FIGURA 2  
 FUENTE: Soulé, 1993

## Fase enteral

1. *T. spiralis* no tiene un huésped específico. Todos los mamíferos son susceptibles. La infección se obtiene por la ingesta de carne cruda o mal cocida conteniendo larvas infectivas de la primera etapa en tejido de músculo esquelético estriado. En este punto el gusano mide 1 mm de longitud por 35µm de diámetro. (Despommier, 1987)

2. Los parásitos son liberados del tejido muscular ingerido por enzimas digestivas del estómago y después son liberados al intestino delgado. (Despommier, 1987)

3. Dentro del intestino delgado las larvas rápidamente penetran al epitelio columnar y ésta es ahora considerada como parásito intracelular. Aquí los gusanos sufren cuatro mudas en 48 horas aproximadamente desarrollándose en adultos machos o hembras. (Despommier, 1987)

Se observó que el gusano macho muda aproximadamente a las 9,13,18 y 25 horas, mientras que la hembra muda a las 10,15,21 y 28 hrs. (Kozek, 1971)

Estudios de la ultraestructura de la larva de *Trichinella spiralis* revelan que no ocurren mudas durante las fases intrauterinas o intramuscular de desarrollo; las cuatro mudas que sufre el parásito fueron demostradas durante la fase intestinal de desarrollo. (Kozek, 1971)

4. El apareamiento ocurre dentro de las 30 horas después de la infección. La localización precisa en el intestino donde se lleva a cabo el apareamiento es indeterminada. (Despommier, 1978)

Tanto la larva de *T. spiralis* como el adulto fueron localizados en la región del intestino delgado situada debajo del epitelio columnar y por encima de la lámina propia; el epitelio columnar se observa muy distorsionado y en contraste, no hay alteraciones morfológicas en la región de la lámina propia adyacente al parásito. (Despommier, 1978)

Después del apareamiento los gusanos adultos residen dentro del nicho intramucelular. Su nicho celular consiste de una línea de aproximadamente 117 células epiteliales columnares, por lo que a esta etapa se le conoce como intramucelular. (Despommier, 1987)

5. Dentro de 5 a 6 días después de la infección, las hembras empiezan a arrojar larvas vivas dentro del ambiente intracelular. La larva recién nacida mide 80 µm de longitud por 6-7 µm de diámetro. La larva recién nacida penetra en el tejido de la lámina propia usando su estilete para atravesar. Ellas después entran una a una y drenan por la linfa a vasos sanguíneos [ver figura 3]. (Despommier, 1987)

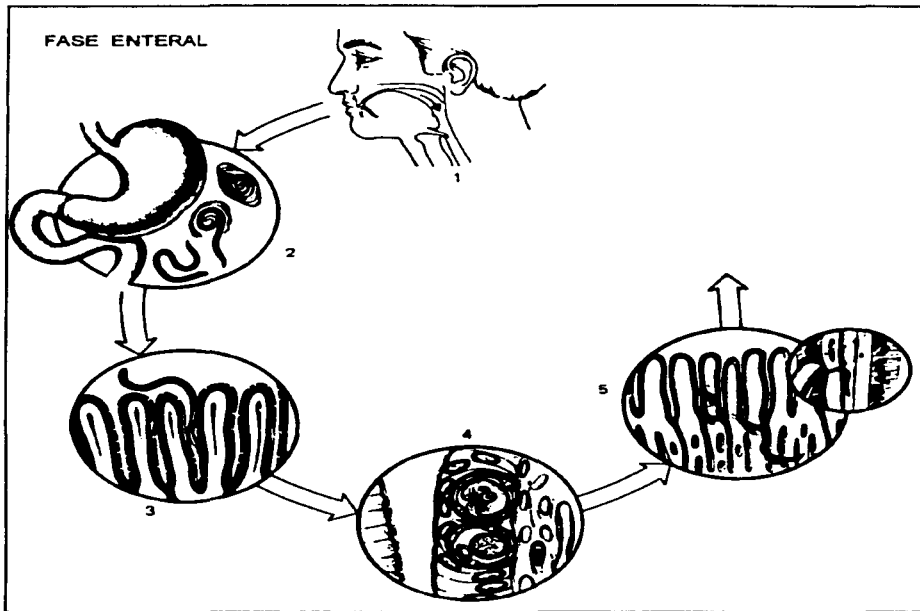


FIGURA 3  
FUENTE: Despommier, 1987

## Fase parenteral

6. La larva eventualmente entra a circulación general y llega a distribuirse por todo el cuerpo. (Despommier, 1987)

Mattof (1967) concluyó que la diseminación es pasiva a través de la vía sanguínea y linfática y aisló larvas de la vena porta, nódulos linfáticos mesentéricos y ductos torácicos de animales con infección intestinal activa. (Dennis, 1970)

7. La penetración a tejido por la larva recién nacida parece ocurrir únicamente por el uso del estilete del esófago. (Despommier, 1987)

La migración de las larvas recién nacidas se lleva a cabo penetrando los capilares, dentro de cualquier tejido adyacente a vaso, pero únicamente dentro de células de músculo esquelético estriado, principalmente diafragma, laringe, lengua, intercostales, bíceps, pectorales y maceteros. (Despommier, 1987)

Las larvas muestran una preferencia hacia los músculos con una gran actividad metabólica, debido a que poseen una mayor irrigación sanguínea; así se afectan más intensamente los músculos que mantienen una actividad constante. (Chester, 1990; Bada, 1986; Stewart, 1980; Robbins, 1990)

La mayor producción de larvas tiene lugar durante la segunda semana de la infección, y la invasión máxima se observa en músculos relativamente carentes de glucógeno. (Chester, 1990)

En un estudio realizado en ratas se observó que los números promedio de las larvas encontradas en cada grupo muscular fueron desiguales y que fueron en aumento según el incremento de larvas inoculadas por gramo de peso del animal. (González, 1988)

Las larvas que se encuentran en otros tejidos que no sean músculo estriado vuelven a entrar a circulación general. Para así diseminarse a los músculos ya mencionados. (Despommier, 1987)

El estadio infectivo de *T. spiralis* (larva L1), la cuál es de los más grandes de todos los parásitos intracelulares, reside únicamente en células alteradas de músculo esquelético estriado. (Despommier, 1990)

8. La larva se cultiva y diferencia dentro de la matriz intracelular de la célula de músculo infectado. Durante este proceso, la larva induce cambios dramáticos en la célula muscular, resultando en un nuevo arreglo total citoplasmático del huésped. (Despommier, 1987)

Algunos de los cambios que la célula muscular sufre incluyen la agregación de mitocondrias, alargamiento del núcleo con la aparición de nucléolos prominentes y la

hipertrofia del glicocálix en una cubierta gruesa de colágena desarrollando una compleja red de vénulas que al parecer facilitan el transporte de nutrientes. Esta estructura es independiente del resto del tejido muscular y funciona almacenando nutrientes para la célula misma como para la larva muscular, y a la vez, exporta desechos metabólicos y productos derivados del parásito al espacio extracelular. (Yépez-Muliá, 1994; Despommier, 1990;)

No se saben las bases moleculares de los cambios ocurridos en la transformación morfológica de la célula. Una posibilidad es que la invasión por parte de las proteínas secretadas por las larvas juegan un papel importante en la modulación. (Despommier, 1990)

9. Más modificaciones celulares del huésped resultan hacia el día 10 o 12, cuando la célula nodriza esta casi madura. El nombre describe la actividad de esta célula, el propósito de la larva es la adquisición de nutrientes y exportación de desperdicios metabólicos. (Despommier, 1987)

10. El complejo larva-célula nodriza es completamente maduro a los 20 días después de la infección. (Yépez-Muliá, 1994)

Esta larva de la primera etapa ha logrado ahora su máximo desarrollo. Aumenta 270 veces su tamaño y comienza a enrollarse y se completa la formación del quiste a partir de los componentes del huésped, en un mes aproximadamente. (Despommier, 1987)

Se cree que la formación del quiste sirve para proteger a la larva de la respuesta inmunológica del huésped. Toda la pared quística es el resultado de la reacción de los tejidos del huésped, por lo que es inducida, y no secretada, por la larva. (Chester, 1990)

11. Cualquier especie de mamífero puede servir como reservorio de la infección, pero la transmisión de animal a animal es en gran parte por canibalismo. (Despommier, 1987)

Los cerdos de Europa, Asia y Norte de América, son usualmente el origen de infección. Osos polares, jabalíes y cerdos salvajes son comúnmente reservorios responsables de infección en climas glaciales y tropicales [ver figura 4]. (Despommier, 1987)



FASE PARENTERAL

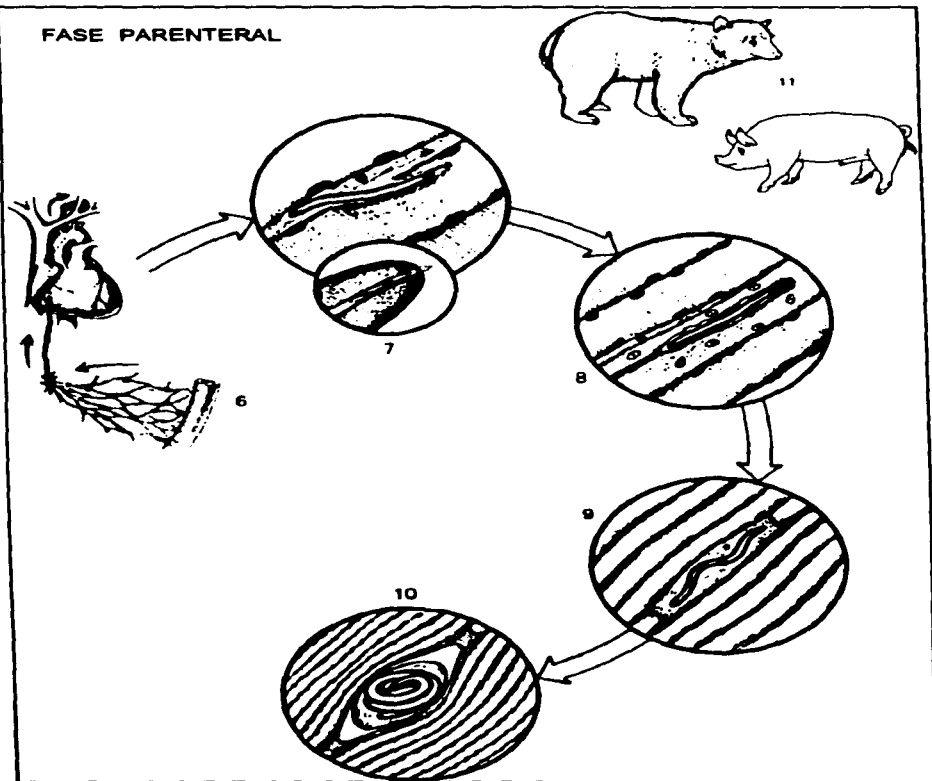


FIGURA 4

FUENTE: Despommier, 1987

## MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

Aunque los parásitos adultos como las larvas enquistadas de *Trichinella spiralis* se desarrollan dentro del mismo huésped, se necesitan dos huéspedes para completar el ciclo vital. (Chester, 1990)

Estudios epidemiológicos recientes indican que la transmisión de *T. spiralis* en un ecosistema agrícola puede involucrar una completa interacción entre cerdos, ratas, animales silvestres residentes y animales feroces. (Leiby, 1990)

Se pueden distinguir dos ciclos en la fuente de infección y modo de transmisión, el doméstico (sinantrópico) y el silvestre [ver figuras 5 y 6]. (Ancha, 1989)

El ciclo doméstico se divide en dos tipos: a) de cerdo a cerdo, en lugares en que esta muy extendida la costumbre de alimentarlos con basura doméstica; b) de rata a rata, con o sin infección apreciable en cerdos. (Chester, 1990)

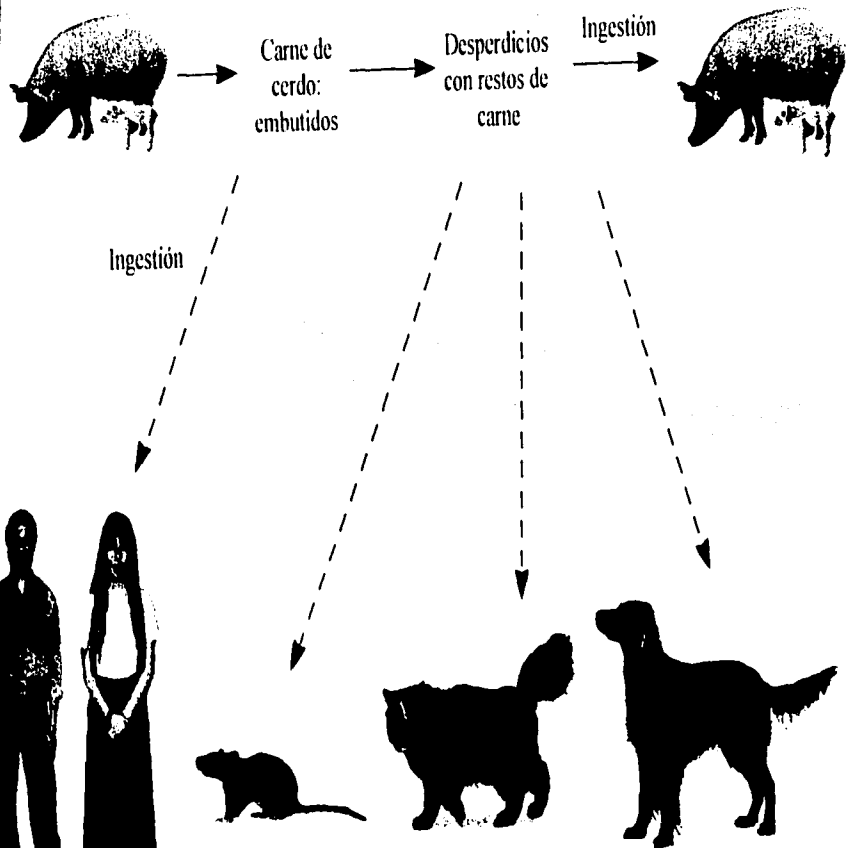
El ciclo doméstico y peridoméstico tiene como eje al cerdo y engloba a animales, tales como el perro, el gato y la rata. El parásito se transmite de uno a otro cerdo, sobre todo por la ingestión de desechos que contienen fibras musculares de origen porcino. Por tal motivo, la incidencia en cerdos es particularmente alta cuando se les alimenta con residuos de cocina, restaurantes y mataderos, o cuando se les mantiene en basureros de las poblaciones. La larva enquistada es muy resistente a la putrefacción, de modo que otra fuente de infección para el cerdo puede ser la carne de cadáveres de animales infectados, entre ellos las ratas. (Ancha, 1989)

El canibalismo entre cerdos está identificado como una importante ruta de transmisión. Se ha demostrado que los cerdos suelen comer ratas; ésto sugiere que las ratas juegan un importante papel en la transmisión de *T. spiralis* en el cerdo; particularmente en lugares donde la población de ratas con *T. spiralis* es abundante; y la probabilidad de transmisión aumenta cuando los cerdos son pobremente mantenidos. (Leiby, 1990)

También se ha comprobado que un cerdo puede adquirir la infección de otro cerdo por coprofagia durante las primeras 24 horas siguientes a la ingestión de carne infectada por uno de ellos, debido a larvas enquistadas que se encuentran en las materias fecales de estos animales, así como de ratas, carnívoros y otros animales infectados. Sin embargo, este modo de infección parece ser raro. (Chester, 1990; Goldsmith, 1995; Ancha, 1989)

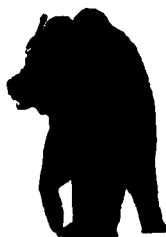
Los perros, gatos y ratas se infectan de las mismas fuentes que los cerdos y quedan incluidos en el ciclo, pero su papel epidemiológico es secundario. (Ancha, 1989)

**Figura 5. Triquinosis. Ciclo sinantrópico de transmisión.**



**Figura 6. Triquinosis. Ciclo silvestre de transmisión.**

Mamíferos silvestres.  
Especialmente carnívoros.



Otras especies  
naturalmente  
infectadas con  
*T. spiralis*.

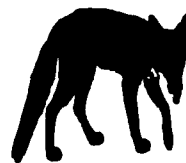


Carroña

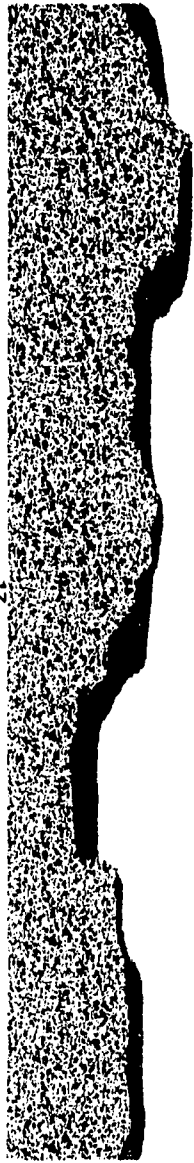
Ingestión

Ingestión

Ingestión



Más de 100 especies  
silvestres naturalmente  
infectadas con  
*T. spiralis*.



El hombre se involucra en el ciclo que él mismo crea, al alimentar a los cerdos con residuos crudos de carne de otros cerdos parasitados. Sin embargo, el hombre es un huésped accidental, en el que el parásito no encuentra salida. (Ancha, 1989)

El ciclo silvestre es independiente del ciclo doméstico. Los carnívoros silvestres son los reservorios principales y los huéspedes primarios de *T. spiralis*. El principal modo de transmisión es el consumo de carroña, constituida por lo general de animales viejos que son los más intensamente parasitados. Los perros tienen un contacto apreciable con el biotipo de animales silvestres y podrían servir de huéspedes de enlace entre ambos ciclos. (Ancha, 1989)

## EPIDEMIOLOGIA

La triquinosis es cosmopolita, exceptuando Asia, las islas del pacífico (aunque se encuentra en cerdos salvajes de Hawái), Puerto Rico y Australia. (Brown, 1985)

La distribución de esta parasitosis en México no se conoce con exactitud pero se tienen antecedentes de brotes epidémicos aislados en diversas entidades federativas del país, prevaleciendo en los estados de Zacatecas, Durango, Estado de México y el Distrito Federal. (Alvarez-Chacón, 1992)

La triquinosis probablemente ha existido en México, por lo menos desde que se introdujo el cerdo al país con la conquista de los españoles. (Alvarez-Chacón, 1992)

*Trichinella spiralis* se ha encontrado en todo el mundo e infecta a una gran variedad de especies de mamíferos. Una lista publicada de hospederos en los cuales este organismo puede ser aislado en forma natural incluye, representantes de todos los órdenes. (Despommier, 1990)

*T. spiralis* tiene una amplia gama de huéspedes entre los animales domésticos y silvestres. La infección se ha comprobado en 104 especies de mamíferos (58 especies de carnívoros, 27 de roedores, 7 de insectívoros y 12 de otros órdenes). Entre los animales domésticos resultan de especial interés los cerdos, cuya carne y subproductos son la fuente principal para el hombre. (Ancha, 1989)

La triquinosis es una enfermedad de los animales silvestres y domésticos que accidentalmente se transmite al hombre por ingestión de carne y productos cárnicos (chorizos, salchichas y cecinas caseras) crudos o insuficientemente cocidos. Es una zoonosis de origen alimentario. (Quiroz, 1988; Contreras, 1992)

Hasta 1970, habían sido constatados en México casos autóctonos evidentes de triquinosis. (Schenone, 1984)

En 1974 se presentó un brote de triquinosis en Yautepec, Morelos que involucró a 31 personas, las cuales habían participado en una comida campestre en donde habían ingerido longaniza procedente del mismo lugar. (S.S.A., 1975)

En 1975, hubo una epidemia en la Ciudad de México, probablemente originada de cecinas adquiridas en Yautepec, Morelos. (Schenone, 1984)

Entre 1975 y 1979 se detectaron numerosos brotes de triquinosis en el Estado de Zacatecas que en conjunto afectaron probablemente a más de 100 personas y provocaron la muerte por lo menos de 6 de ellas. (Villacaña, 1984)

A mediados de 1978, en la localidad de Naucalpan, Estado de México, hubo un brote que afectó a cuatro de siete integrantes de un grupo familiar, los cuales consumieron chorizo procedente de Durango. (Martínez-Marañón, 1979)

En marzo de 1978 se identificó un brote de triquinosis en la ciudad de Jerez, Zacatecas. Un segundo brote se desarrolló simultáneamente en la ciudad de Jalpa, Zacatecas iniciándose en abril de 1978. (Fragoso, 1985)

En 1982 se produjeron por lo menos dos brotes de triquinosis que afectaron en conjunto a 19 personas, en el estado de Zacatecas. (Villacaña, 1984)

En 1979 se desarrolló en Zacatecas el brote epidémico que más ha llamado la atención debido a su alta letalidad (ya que de 18 pacientes, 6 fallecieron). Ocurrió en la localidad de Laguna de Carretero, Zacatecas. (Fragoso, 1985)

En el año de 1988 ocurrieron 2 pequeños brotes de triquinosis en Ciudad Delicias, Chihuahua que afectaron a 13 y 20 personas respectivamente. (Hernández, 1992)

En 1990, se reportaron cuatro casos de triquinosis aguda detectados en una familia de Ixtapalapa, México, D.F., la cual consumió chorizo crudo procedente de Villanueva, Zacatecas; en el que se lograron aislar las larvas de *T. spiralis*.

En 1992, Alvarez y cols. realizaron una revisión retrospectiva de los expedientes de 8 pacientes con triquinosis, comparándolos con 16 casos de fiebre tifoidea, durante el periodo de 1970 a 1990, encontrando que la incidencia de triquinosis prevaleció en pacientes entre 5 y 14 años, de bajos estratos socioeconómicos y que habían ingerido carne de cerdo insuficientemente cocida.

Recientemente, se reportó en Ciudad Delicias, Chihuahua, una epidemia de triquinosis que involucró a 166 personas; originándose por el consumo de chorizo de cerdo mal cocido (Hernández y cols., 1992)

En uno de los últimos reportes (Contreras y cols.,1992) se examinaron los músculos diafragmáticos de 600 cerdos sacrificados en el rastro municipal de la Ciudad de Zacatecas, sugiriendo que cuando menos uno de cada 100 cerdos sacrificados en el rastro están infectados con *T. spiralis* constituyendo una fuente potencial de infección para el hombre.

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. Se estima que un sólo cerdo de 100 Kg de peso, puede ser una fuente potencial de infección para 360 personas. El mezclar la carne de cerdos con la de vacunos o moler carne de res en la misma máquina donde se molió carne de cerdo, es otro factor de infección. (Ancha, 1989)

Los tabúes religiosos sobre la carne de cerdo explican la ausencia del padecimiento en hindúes, judíos y musulmanes, adventistas del séptimo día y otros vegetarianos (Brown, 1985)

## **SINTOMATOLOGIA**

En relación con la sintomatología, tanto en el hombre como en animales de experimentación, el curso clínico de la triquinosis depende en gran manera de la intensidad de la infección. (Yépez-Muliá 1994; Robbins, 1985)

La intensidad de las manifestaciones clínicas guarda relación con el estado inmunitario del huésped, infecciones previas y el número de larvas esparcidas en los tejidos musculares ingeridos. Los síntomas van desde asintomáticos en infecciones leves a graves en las que se presentan con gran número de parásitos. Se estima que la ingesta de 70 larvas viables produce la enfermedad clínica humana. (Goldsmith, 1995 ; Zamora-Chávez, 1990 ; Harrison, 1991)

La severidad del cuadro clínico depende, como ya se menciona, del número de quistes viables ingeridos, clasificándose en tres cuadros clínicos:

- 1) Asintomática o triquinosis subclínica.
- 2) Oligosintomática.
- 3) Polisintomática; la cuál puede ser de acuerdo a la intensidad del padecimiento:
  - a) Leve
  - b) Moderada

c) Severa. (Martínez-Pantaleón, 1986)

Las alteraciones anatomopatológicas y la sintomatología se dividen en tres etapas sucesivas: 1) intestinal; 2) invasión muscular, y 3) convalecencia; que corresponde aproximadamente con las fases de: a) incubación o invasión intestinal, b) aguda o de migración larvaria, y c) crónica o de encapsulación, respectivamente. En la tabla 2 se muestran los criterios diagnósticos de triquinosis. (Chester, 1990 ; Yépez-Muliá, 1994)

TABLA 2

Criterios diagnósticos de triquinosis.

<b>Específicos</b>	<b>Inespecíficos</b>
Mialgias generalizadas	Dolor abdominal
Mialgias oculares	Diarrea
Edema de párpados, cara y manos	Vómito
Postración	Pérdida de peso
	Exantemas

Fuente: Yépez-Muliá, 1994

### **Etapas intestinal**

Puede estar ausente pero si se presenta el inicio es repentino, inicia dos a siete días después de la infección. (Goldsmith, 1995; Zamora-Chávez, 1990)

La inflamación de la mucosa intestinal y yeyunal producida por la penetración y desarrollo de los gusanos adultos puede producir síntomas de malestar, náuseas, diarrea, dolor abdominal y en algunos casos vómito. Este cuadro suele diagnosticarse como intoxicación alimentaria aguda, sobre todo por que en general se afectan simultáneamente grupos de personas. Durante la fase intestinal es excepcional la muerte del paciente. (Chester, 1990; Yépez-Muliá, 1994)



## **Etapa de invasión muscular**

Esta etapa comienza durante la segunda semana después de la infección y los síntomas pueden persistir de una a cinco semanas post-infección. (Goldsmith, 1995; Zamora-Chávez, 1990)

La fiebre y edema facial (particularmente en torno a los ojos, los lados de la nariz, las sienes y las manos) son seguidos por mialgias, debilidad e hinchazón de los músculos afectados y eosinofilia periférica. Otros síntomas menos frecuentes son cefaleas, enrojecimiento súbito de la cara, conjuntivitis, prurito, diaforesis, anorexia y sed. Los ganglios linfáticos están con frecuencia aumentados de tamaño e hipersensibles a la palpación. La lesión de los músculos en esta fase puede provocar dificultad para el movimiento de los ojos, la respiración, la masticación, la deglución, la emisión de palabras o el uso de las extremidades. (Chester, 1990; Goldsmith, 1995)

La fiebre suele aparecer al comienzo de la invasión muscular, alcanza un nivel máximo en unos días o una semana y persiste por lo general durante un período de otros dos a siete días con menor intensidad. (Chester, 1990)

La eosinofilia periférica aparece a la segunda semana y alcanza un nivel máximo a la tercera o cuarta semana post-infección, suele ser al menos del 20 por ciento y por lo general excede el 50 por ciento y puede llegar incluso al 90 por ciento. (Chester, 1990)

La manifestación más grave de la triquinosis es la miocarditis, la muerte por ésta suele producirse entre la cuarta y la octava semana de evolución. En esta etapa el paciente puede sufrir también encefalitis, meningitis y trastornos neurológicos. (Chester, 1990)

## **Etapa de convalecencia**

Después de tres a cuatro semanas, la etapa de invasión muscular cambia hacia la de convalecencia que puede durar varios meses. El encapsulamiento de la larva ocurre alrededor de la quinta semana y la calcificación de la pared del quiste se inicia durante el quinto o sexto mes y se completa después del año. (Goldsmith, 1995; Zamora-Chávez, 1990)

La fiebre suele desaparecer, los síntomas musculares comienzan a remitir y si el edema ha sido intenso, puede haber diuresis. Finalmente, el paciente recupera el apetito y su estado general mejora. (Chester, 1990)

## INMUNIDAD

En el caso de *T. spiralis* se ha observado que cada estadio de su ciclo de vida posee características particulares tanto ultraestructurales como bioquímicas e inmunológicas. (Yépez-Muliá, 1994)

*T. spiralis* secreta una variedad de proteínas dentro del huésped durante cada estadio de su ciclo de vida, algunas de estas proteínas despiertan la respuesta inmune del mismo. La inmunización con varios de estos antígenos secretados provee una protección contra subsecuentes infecciones, comparables a la que se presenta en una infección natural. (Despommier, 1990)

Se ha observado que en el adulto de *T. spiralis* su metabolismo energético es de tipo aerobio, mientras que el complejo célula nodriza-parásito funciona como una unidad anaeróbica. (Despommier, 1993)

En los últimos años se ha dedicado especial atención a la caracterización de antígenos (moléculas que inducen la formación de anticuerpos) de la larva muscular del parásito, debido principalmente a que este estadio del parásito participa activamente en la inducción de inmunidad protectora. Estos componentes pertenecen principalmente a dos compartimentos del parásito: al esticosoma (órgano secretor) y la cutícula de éste. (Yépez-Muliá, 1994)

Se observó que el anticuerpo monoclonal NIM-M1 reacciona con epítomos expuestos en la superficie de la larva muscular, mientras que el anticuerpo monoclonal NIM-M2 no presenta reacción con la superficie del parásito vivo. Estudios inmunocitoquímicos en cortes histológicos de los tres estadios del parásito y empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 demostraron que este reaccionaba con la superficie así como con el esticosoma de la larva muscular sugiriéndose la existencia de epítomos compartidos por componentes de éstos dos compartimentos del parásito. También se observó que el anticuerpo monoclonal NIM-M1 reconoce epítomos presentes en el esticosoma de organismos adultos, lo cual podría explicar el hecho de que la inmunización de animales de investigación con la larva muscular induce la expulsión acelerada del organismo adulto. (Yépez-Muliá, 1994)

La mayoría de los anticuerpos analizados reconocen específicamente componentes de la larva muscular con un patrón de reactividad similar, reaccionando con moléculas con pesos moleculares comprendidos entre 45-70 KDa y 115-120 KDa. (Yépez-Muliá, 1994)

Como resultado de estos análisis se acordó clasificar a los antígenos de los tres estadios del parásito de acuerdo con la reactividad presentada, quedando los antígenos de superficie y de excreción-secreción dentro del grupo Ts-L1. (Tabla 3) (Yépez-Muliá, 1994)

**TABLA 3**

**Patrón de reactividad de anticuerpos hacia diferentes fracciones antigénicas de *T. spiralis* analizadas por inmunoelectrotransferencia.**

Antígenos	Peso molecular de componentes antigénicos	Anticuerpo monoclonal	Clasificación
Extracto de LM *PSE de LM --**	40-70	9D4	Ts-L1
	115-120	9E6	
	45-60	18H	
		30S	
		Ho-1	
		Tsp 130	
		NIM-M1 7C2C5	
Extracto de LM	36	6D8	Ts-L2
PSE de LM	45	6D8	Ts-L2
Extracto de LM PSE de LM	18	Ho-5	Ts-L3
Extracto de LM PSE de LM	30-40,45,49	6B1	Ts-L4
PSE de adulto	40	10E8, 1E11-1G8	Ts-A1
Extracto de LM Extracto de adulto	37	Ts-2	
Extracto de LRN***		Ho-2	Ts-L/A/, LRN

24

\*LM: Larva muscular

\*\*PSE: Productos de excreción/secreción

\*\*\*LRN: Larva recién nacida

Fuente: Yépez-Mulíá, 1994

El epítipo reconocido por los anticuerpos monoclonales probados, es el carbohidrato de las glicoproteínas. La inmunogenicidad de este epítipo es alta, por lo que se sugiere que puede ser útil en el diagnóstico de triquinosis en varios huéspedes. (Yépez-Muliá, 1994)

La respuesta inmune de humanos contra infecciones con *T. spiralis* se ha estudiado principalmente a nivel de la respuesta humoral (mediada por anticuerpos), determinándose la presencia de diferentes clases de inmunoglobulinas dirigidas contra el parásito, su secuencia de aparición, así como el tipo de componentes reconocidos principalmente por estos anticuerpos. Se ha detectado durante los primeros veinte días de la enfermedad, anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA, determinándose en un principio de la infección la presencia de IgG1, seguida de la IgG3 y posteriormente la IgG4. La detección de esta última subclase se relacionó con infecciones crónicas. Así mismo, se ha puesto de manifiesto que sueros de humanos infectados con *T. spiralis* reconocen preferencialmente los componentes de superficie de la larva muscular, aunque también la respuesta humoral está dirigida contra productos de excreción-secreción. (Yépez-Muliá, 1994)

En relación con la respuesta inmune celular (respuesta mediada por linfocitos T y otros factores humorales) que se induce en humanos durante la infección por *T. spiralis*, se sabe que en la mucosa del intestino delgado de pacientes con triquinosis existe un incremento de células cebadas (células que contiene gránulos con histamina, serotonina, factores quimiotácticos, etc. capaces de liberarse con un estímulo antigénico). (Yépez-Muliá, 1994)

En cuanto a la respuesta inmune en modelos murinos en una infección producida por *T. spiralis* aparecen linfocitos en los nódulos linfáticos mesentéricos con reactividad hacia el antígeno, hay una infiltración de neutrófilos hacia la mucosa intestinal, células cebadas y eosinófilos. (Denkers, 1990)

La inducción de una respuesta inmune humoral en modelos murinos hacia los componentes de superficie de los tres estadios de desarrollo de *T. spiralis*, se ha observado que es estadio-específica. (Yépez-Muliá, 1994)

El problema para elucidar los mecanismos inmunológicos que controlan la infección de *T. spiralis* es complicado, por la naturaleza heterogénea de los estímulos antigénicos, la complejidad del parásito y porque en las mudas que sufre éste dentro del huésped expresa diferentes antígenos. Se ha detectado un grupo de moléculas específicas de estadio L1, correspondientes al grupo antígeno II que expresan un epítipo inmunodominante común, que provoca una fuerte respuesta de anticuerpos cuatro semanas post-infección, aunque los linfocitos T reactivos al grupo antígeno II son detectados tres días después de la infección. (Denkers, 1990)

En relación con los mecanismos de defensa del huésped, se ha observado que la expulsión rápida de adultos constituye el principal mecanismo de defensa en contra de la infección por *T. spiralis*. Así, varios estudios en modelos murinos han aportado evidencias que sugieren que la

expulsión de los organismos adultos 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. También se ha demostrado un incremento en la concentración de proteinasas de las células cebadas del intestino, sugiriéndose que éstas pueden participar en la inducción de cambios en la permeabilidad del epitelio intestinal, promoviendo así el paso de moléculas al lumen del intestino. Otro nivel de acción de los mecanismos de defensa del huésped están dirigidos contra la larva recién nacida, hacia la cual se han determinado efectos citotóxicos de eosinófilos mediados por anticuerpos. (Yépez-Muliá, 1994)

Las moléculas de excreción-secreción de 49 y 53 KDa de la larva muscular, purificados con el anticuerpo monoclonal 7C2C5, protegen a ratones contra el desafío de *T. spiralis*, determinándose por la expulsión acelerada de los organismos adultos y la reducción en la fecundidad de la hembra. (Yépez-Muliá, 1994)

Se ha demostrado que las moléculas de superficie y algunos de los componentes de excreción-secreción de la larva muscular del parásito son inmunodominantes (reconocidos preferencialmente por el sistema inmune del huésped) en todos los huéspedes hasta ahora analizados. Estas moléculas son reconocidas por anticuerpos producidos tardíamente en la infección (35 días post-infección), siendo el isotipo predominante la IgG1 y se ha determinado que están dirigidos en contra de un carbohidrato denominado G2.1. (Yépez-Muliá, 1994)

Otro aspecto relevante que debe ser considerado al estudiar la inducción de inmunidad contra la infección por *T. spiralis* se refiere al tipo de clases de linfocitos T cooperadores que se inducen durante la respuesta inmune al parásito. Los T1 son inducidos específicamente por el antígeno, se localizan en el bazo de los animales infectados, mientras que los linfocitos T2 estimulados se encuentran en los ganglios linfáticos mesentéricos. T2 es la población que se induce predominantemente en este tipo de infecciones. Además se ha observado una correlación entre la inducción preferencial de T2 durante una infección con *T. spiralis* y los cambios inmunes presentes en animales infectados. Entre estos cambios se ha reportado la inducción de un proceso inflamatorio en el intestino, incremento en el número de células cebadas, eosinofilia y niveles altos de IgE. La mastocitosis intestinal y la inflamación son controladas por una variedad de interleucinas (IL) producidas por T2, incluyendo IL-3, IL-4, IL-9, e IL-10. Por otro lado, se ha demostrado que otras interleucinas producidas por esta población celular, como la IL-5 es importante en la producción de eosinófilos y la IL-4 en la producción de IgE. (Yépez-Muliá, 1994)

Respecto al estudio de la respuesta inmune en cerdos, una observación interesante ha sido el hecho de que la expulsión de organismos adultos en el intestino de animales infectados parece depender de la dosis de larvas musculares con la cual se realice la infección. De esta forma, cuando la dosis infectante es alta se da la expulsión más rápida de los organismos adultos. Aunado a esto, la expulsión significativa de adultos durante una infección primaria no se realiza sino hasta después de 21-22 días, a diferencia de los ratones, la cual se presenta a partir del décimo día. La persistencia de los organismos adultos pudiera deberse a un nivel de

inmunidad muy baja en el intestino, lo cual da como resultado una carga parasitaria de larvas musculares más alta que las obtenidas en modelos murinos. Durante una infección secundaria en cerdos se observa resistencia completa al estadio de larva recién nacida y existe una inhibición muy marcada de la fecundidad de la hembra, siendo éste un factor importante en la reducción de la carga parasitaria de larvas musculares del parásito. (Yépez-Muliá, 1994)

Nuevamente con los componentes purificados de superficie-esticosoma (S/S) de *T. spiralis*, se observó que se producen anticuerpos en todos los animales infectados experimentalmente, apareciendo éstos en la semana tres a cuatro post-infección. (Arriaga, 1994)

A pesar de los estudios que se han realizado para entender algunos aspectos de la respuesta inmune en cerdos, se requiere obtener mayor información acerca de los mecanismos que regulan dicha respuesta inmune durante una infección por el parásito. (Yépez-Muliá, 1994)

## **ANTIGENOS DE *T. spiralis***

La presencia de proteasas parece ser una característica muy común en extractos crudos del parásito y en productos de excreción-secreción; además se sabe que estas enzimas están implicadas de manera importante en la interacción huésped-parásito. (Armas-Serra, 1995)

Las larvas de *T. spiralis* secretan una gran variedad de proteasas en cada fase de su ciclo de vida. Los productos de excreción-secreción de parásitos helmintos, sabemos que contienen una gran variedad de enzimas, incluyendo: acetilcolinesterasas, superóxido dismutasa y proteinasas (descrito por Knox, 1994). Según Matthews en 1977 y Robertson y cols. en 1989 estas enzimas se ven implicadas en la invasión al huésped. Mc Kerrow y Doenhoff en 1988 indicaron la participación de estas enzimas en la nutrición del parásito. En 1974 Rothwell y en 1983 Rhoads mencionaron que estas enzimas estimulan la respuesta de anticuerpos en huéspedes infectados. En 1988 Knox y Kennedy; Britton y cols. 1992 determinaron que estos anticuerpos pueden inhibir esta actividad enzimática. Más aún esta ahora claro que enzimas de helmintos pueden estimular inmunidad protectora en el huésped y quizá ser alérgenos potentes. (Todorova, 1995)

Extractos de esticosoma parcialmente purificados, productos de excreción-secreción de la larva muscular o antígenos de excreción/secreción purificados con anticuerpos monoclonales han obtenido un incremento en la especificidad y sensibilidad del diagnóstico en la infección, pudiéndose detectar cerdos aún con cargas parasitarias muy bajas. En diferentes partes de la República Mexicana se demostró que el uso del extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* da lugar a la detección de reacciones positivas no específicas, las cuales disminuyen

totalmente con el uso de antígeno de superficie/esticosoma purificado o los productos de excreción/secreción de la larva muscular, la utilización de estos últimos incrementa la sensibilidad y especificidad del diagnóstico de *T. spiralis* en cerdos. (Yépez-Muliá, 1994)

El aislamiento de un fragmento antigénico que consta de una glicoproteína de peso molecular de 45 KDa fue reconocido por todos los sueros humanos y cerdos infectados por *T. spiralis* en un análisis, utilizando como técnica el western-blot. (Homan, 1991)

Los antígenos predominantemente encontrados en productos de E/S de larvas musculares L1 están agrupados en el rango de 45-55 KDa, y son designados TSL-1, estos antígenos son los responsables en la respuesta serológica a cerdos infectados con *T. spiralis*. En todas las especies que abrigan infecciones de *Trichinella* aparece la respuesta a los antígenos TSL-1 de una manera similar, de esta manera suero de humanos, cerdos, osos, jabalíes salvajes, mapaches y zarihuellas pueden ser exitosamente probados por ELISA para la triquinosis usando estos extractos de los antígenos mencionados. (Gamble, 1993)

Los antígenos E/S y las proteínas de la cutícula fueron reconocidos sólo por anticuerpos producidos tardamente en la infección. El isotipo predominante en el día 42 fue IgG1 y el 80% de estas IgG1 reaccionaron con un fragmento de determinantes antigénicos que virtualmente esta en todos los antígenos (grupo IIA) siendo específico de estadio. El antígeno del grupo IIA es un componente de los productos de excreción/secreción del estadio de la larva muscular L1 y este incluye algunos de los antígenos caracterizados por otros, como el de 48 KDa y el de 50/55 KDa, que fue descrito por Silbersten y Despommier y el de 45, 49 y 53 KDa descrito por Gamble. (Denkers, 1990)

Estudios en secciones de músculo infectado revelan que el antígeno de 43 KDa estuvo presente únicamente en el gusano durante el día 7 de la infección. El día 9 después de la infección, el esticosoma y la cutícula superficial de la larva y el citoplasma y nucleoplasma de cada núcleo de la célula nodriza reaccionaron con el anticuerpo monoclonal dirigido contra este antígeno. El citoplasma de la célula nodriza y su reactividad nuclear se incrementaron con intensidad hasta el día 18 después de la infección. Estos resultados sugieren que los antígenos esticocito-específicos son sintetizados durante la fase temprana de la infección en el músculo, y que al ser desarrollado el complejo célula nodriza-parásito, algunos antígenos son secretados dentro del ambiente de la célula nodriza. (Despommier, 1990)

Por otro lado, en las moléculas de superficie/esticosoma y de excreción-secreción de la larva muscular el epítipo principal reconocido en estas moléculas es el carbohidrato tívelosa. Este azúcar es específico de *Trichinella* ya que no se encuentra en otros helmintos y se ha sugerido su uso en el diagnóstico de triquinosis porcina. Sin embargo, la tívelosa se encuentra presente en la pared de ciertas bacterias como por ejemplo *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, las cuales frecuentemente causan infecciones a cerdos, por lo que el empleo de este azúcar en el diagnóstico de la infección podría dar reacciones cruzadas. (Yépez-Muliá, 1994; Su y Prestwood, 1990; Wiegler, 1992)

## DIAGNOSTICO

En el hombre el diagnóstico clínico de pacientes comprendidos en un brote no presenta mayor dificultad, pero debido a la sintomatología proteiforme de la triquinosis, los casos esporádicos se confunden muchas veces con otras enfermedades. (Ancha, 1989)

En las fases iniciales hay que establecer el diagnóstico diferencial con la intoxicación alimentaria aguda, el cólera, la diarrea o la disentería de otros orígenes. Con frecuencia el oftalmólogo es el primer especialista consultado ya que la enfermedad puede comenzar por una hinchazón palpebral con conjuntivitis grave. (Chester, 1990)

Rara vez es posible aislar los gusanos adultos y larvas de las heces, durante la fase diarreica de la enfermedad, o de la sangre, el líquido cefalorraquídeo o la leche durante el período de migración. (Chester, 1990)

La prueba definitiva es la biopsia muscular (en especial gastrocnemio y pectoral, de preferencia en el sitio de inflamación por hipersensibilidad), aunque no siempre es necesario. La posibilidad de tener biopsias positivas es más alta entre la quinta y sexta semana después de la infección. Sin embargo, cualquier biopsia temprana puede ser presuntiva del diagnóstico si muestra la transformación basofílica en la fibra muscular y es definitivo cuando se encuentra la larva enrollada. (Goldsmith, 1995)

La operación es dolorosa y en las infecciones leves, por lo reducido de la muestra, no siempre se encuentran larvas. (Ancha, 1989)

La eosinofilia es una ayuda diagnóstica útil en la triquinosis, sobre todo cuando se demuestra su aumento al progresar la enfermedad. Aparece durante la segunda semana, su máximo de hasta noventa por ciento se encuentra durante la segunda y cuarta semana, y después declina hasta lo normal durante los siguientes meses. La ausencia de eosinofilia en una infección con gran número de parásitos comprobado se considera como un síndrome de pobre pronóstico. (Brown, 1985; Goldsmith, 1995)

La orina puede mostrar proteínas elevadas, las enzimas musculares como la fosfoquinasa de creatina y aldolasa, están elevadas, el electromiograma muestra disfunción miopática, la presión del líquido cefalorraquídeo en algunas ocasiones está elevada, con número normal o ligeramente alto de cuenta celular (linfocitos), el azúcar es normal. La velocidad de sedimentación casi siempre es normal, lo que resulta una clave útil para el diagnóstico. (Goldsmith, 1995)

En la actualidad se dispone de un gran número de pruebas inmunológicas, tales como la floculación en bentonita, aglutinación de látex, fijación del complemento, inmunofluorescencia



indirecta, hemaglutinación indirecta, contraelectroforesis, anillo de precipitación, ELISA, radioinmunolectroforesis y la prueba intradérmica de Bachman. (Chester, 1990; Ancha, 1989; Walls, 1986)

Las pruebas serológicas son de mucha utilidad pero no se vuelven positivas hasta la tercera semana, dentro de ellas las pruebas de floculación de bentonita, que emplea el antígeno Melcher, aunque es menos específica y sensible que la ELISA, o la hemaglutinación indirecta. La inmunofluorescencia indirecta es más sensible pero carece de la especificidad de la prueba de floculación de bentonita. (Goldsmith, 1995)

La floculación de bentonita y las pruebas de aglutinación de látex son las pruebas serológicas que pueden ser útiles para el diagnóstico de triquinosis. Tienen la ventaja de que no permanecen positivas por más de un año, por tanto, una prueba fuertemente positiva indica una infección reciente. (Brown, 1985)

El uso de la prueba cutánea de reacción inmediata de Bachman se limita por la falta de estandarización del antígeno y su inestabilidad para distinguir entre infecciones presentes y pasadas. (Goldsmith, 1995)

En las pruebas cutáneas positivas sea cual fuere la intensidad de la infección, aparece de inmediato alrededor del punto de inyección una pequeña pápula blanquecina, rodeada por un habón irregular plano de alrededor de 5 cm. de diámetro. La lectura se hace al cabo de 15 a 20 minutos. (Chester, 1990)

Las diferentes pruebas y antígenos varían tanto en sensibilidad como en especificidad. Se considera que la prueba de ELISA es la más sensible y versátil (permite la detección de las diferentes clases de inmunoglobulinas: IgG en 100% de los casos en el primer mes de la enfermedad, IgM en el 86% de los casos y la del tipo IgA en un 66%). (Ancha, 1989)

La detección de anticuerpos circulantes a *T. spiralis* por ELISA proveen ser un valiente para el diagnóstico de infección en humanos, cerdos y otras especies. Sin embargo la especificidad y la sensibilidad de las pruebas de ELISA dependen de la fuente y calidad del antígeno del parásito usado en la prueba. (Ancha, 1989)

El diagnóstico de la triquinosis porcina reviste gran interés desde el punto de vista del control. Se dispone de dos procedimientos principales para el diagnóstico *post-mortem*: el de triquinoscopia y el de digestión artificial. La triquinoscopia se emplea en la inspección veterinaria de carne porcina en los mataderos y frigoríficos de muchos países. Es un proceso rápido pero poco sensible y no permite descubrir las infecciones leves ya que el tamaño de la muestra es pequeño y restringe la detección de las larvas en el músculo de animales aún con cargas parasitarias altas. (Yépez-Muliá, 1994; Ancha, 1989)

Se ha estimado que la triquinoscopia permite descubrir la infección cuando hay de 3 a 10 o más larvas por gramo de músculo. (Ancha, 1989)

El método de digestión artificial resulta mucho más eficiente, pero es lento y no se adapta al ritmo del procesamiento de cerdos en los mataderos y frigoríficos. Su sensibilidad se debe sobre todo al uso de una muestra que es de 50 a 100 veces mayor que la empleada en triquinoscopía. Ultimamente se ha propuesto una modificación práctica de este método que consiste en mezclar muestras de pilares diafragmáticos de 20 a 25 cerdos de la misma procedencia. Si se encuentran triquinas en la muestra compuesta, se procede al examen individual de cada cerdo con 50 a 100 gramos de tejido muscular diafragmático. (Ancha, 1989)

Este método ha sido aceptado por la comunidad Europea para la detección de la triquinosis porcina en los rastros de estos países, por ser confiable en la detección de infecciones por *T. spiralis* y en comparación con la técnica de triquinoscopía ha resultado ser más preciso y menos laborioso. (Yépez-Muliá, 1994)

De esta forma, es necesario que se apliquen pruebas de diagnóstico de la infección que permitan detectar de una manera sensible y específica si los animales que se encuentran destinados para consumo humano están infectados con *T. spiralis*. (Yépez-Muliá, 1994)

En la actualidad, una alternativa empleada en el diagnóstico de triquinosis, es el uso de métodos serológicos, los cuales han sido reconocidos como métodos potenciales en la identificación de infecciones con parásitos específicos, aún en la ausencia de síntomas clínicos característicos o sin la determinación del parásito. Este tipo de diagnóstico se basa en la presencia en el suero u otros fluidos corporales de anticuerpos específicos contra el parásito. Una de las técnicas más empleadas para este fin es el ensayo de ELISA. La sensibilidad de este ensayo en la determinación de anticuerpos específicos contra *T. spiralis* en cerdos fue demostrada por primera vez por Ruitenber y cols. en 1975. Uno de los mayores obstáculos en el empleo del ensayo de ELISA como método de diagnóstico de triquinosis porcina es la obtención de reacciones falsas positivas cuando se prueban sueros de cerdos no infectados con *T. spiralis*. Esto último se ha atribuido a que algunas fracciones del suero dan reacciones no específicas y por otro lado a los antígenos utilizados en estos ensayos, los cuales generalmente son extractos totales de la larva muscular del parásito. La reactividad cruzada fue causada por la presencia de fosforilcolina de estos antígenos. (Yépez-Muliá, 1994; Su y Prestwood, 1990)

El uso de técnicas como ELISA para el diagnóstico de triquinosis porcina puede dar resultados falsos positivos (Gamble y cols. 1983, Smith 1987), una solución a este problema es que se empleen partes purificadas del antígeno específico. Los productos de E/S (ESP) y antígenos fraccionados proveen la especificidad y sensibilidad de la prueba inmunológica. (Su y Prestwood, 1990)

La fiabilidad de métodos serológicos es muy dependiente de la calidad y especificidad de los antígenos de *T. spiralis* usados. La ocurrencia de reacciones falsas positivas debido al uso del antígeno crudo del parásito se ha informado en cerdos y humanos. (Wieger, 1992)

Los ensayos de ELISA han requerido la utilización de antígenos purificados del parásito lográndose desarrollar métodos de diagnóstico sensibles y altamente específicos. (Yépez-Muliá, 1994)

Una evaluación de campo por ELISA para la triquinosis porcina, muestra que la ELISA usando una preparación de antígenos de E/S tiene altos títulos de especificidad y sensibilidad para la triquinosis porcina. Demostrándose que preparaciones de E/S del antígeno de la larva muscular son altamente satisfactorias. (Murrell, 1986)

Los resultados obtenidos para una ELISA utilizando antígenos purificados de extracto soluble total de la larva muscular, muestran que el 100% de las muestras de suero de pacientes sintomáticos reaccionaron positivamente a la séptima semana post-infección. (Chapa-Ruiz, 1993)

El empleo del método de DOT-ELISA en la detección de anticuerpos específicos contra *T. spiralis* en el suero de humanos con triquinosis, se ha visto que es altamente sensible y específico y requiere de muy pequeñas cantidades de suero. (Yépez-Muliá, 1994)

La producción de antígenos específicos y sensibles definidos del parásito tales como los de superficie/estocoma o de excreción/secreción obtenidos mediante cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales o la preparación de péptidos sintéticos y el empleo de técnicas de ingeniería genética para realizar la clonación de los genes que codifican para los antígenos de interés y que pueden ser expresados en sistemas bacterianos, parecen ser técnicas útiles para el diagnóstico de triquinosis. (Yépez-Muliá, 1994)

Recientemente se ha evaluado la utilización de la técnica de amplificación de DNA (PCR) del parásito para el diagnóstico de infecciones por *Trichinella* empleando oligonucleótidos complementarios a una secuencia repetida de DNA de *T. spiralis* (1.7 Kb), pudiéndose detectar específicamente infecciones con este parásito. (Yépez-Muliá, 1994)

## TRATAMIENTO

Los casos leves pueden no ameritar tratamiento, o bien sólo medidas sintomáticas. Debido a sus pocos efectos secundarios es probable que el mebendazol sea preferible al tiabendazol. Se ha observado que el mebendazol es eficaz en ratas al matar tanto a los gusanos adultos como a las larvas enquistadas. En humanos hay varios informes que sugieren que la dosis del medicamento no está estandarizada. (Goldsmith, 1995)

El más antiguo de los fármacos activos es el tiabendazol, que destruye *T. spiralis* cuando se administra a ratones o cerdos 24 horas después de la inoculación. (Chester, 1990)

En un trabajo de investigación donde se probó el tiabendazol, se comprobó que únicamente los ratones que no recibieron tratamiento para la infección poseían larvas en músculos esqueléticos, indicando así que el medicamento es altamente efectivo en prevenir la migración de las larvas. (Sinski, 1983)

El tiabendazol interfiere con la larvipostrición y destruye algunas larvas enquistadas en el músculo; algunos estudios indican que la eficacia del medicamento es incierta y los efectos secundarios incluyen: mareos, trastornos mentales, rashes y náuseas. En pacientes el tiabendazol a dosis de 25 mg/Kg dos veces al día (dosis máxima total de 3 g diarios) por siete a diez días casi siempre reduce los síntomas, en especial la fiebre y los dolores musculares. (Goldsmith, 1995)

Por lo general, los salicilatos son suficientes para aliviar la cefalea y los dolores musculares, aunque los últimos pueden necesitar codeína o analgésicos más fuertes. (Brown, 1985)

En algunas ocasiones se administra corticosteroides para reducir con rapidez la fiebre y las mialgias. Como los corticosteroides prolongan la larvipostrición en la rata y por lo tanto aumentan el número total de producción de larvas, cuando se usan en pacientes se emplean junto con adulticidas con mebendazol o tiabendazol para interrumpir la larvipostrición. (Goldsmith, 1995)

## **MEDIDAS PROFILACTICAS**

Aunque las larvas enquistadas se mueren a 55°C, se recomienda que la carne de cerdo se cocine a 77°C. Los productos cocidos de puerco deben estar totalmente blancos sin ninguna región visible de jugo rosa, esto es una gufa visual burda. La temperatura a la que también mueren los parásitos es de -15°C por 20 días y a -28.9°C por seis días. La cepa ártica, sin embargo, tiene cierta resistencia al congelamiento. (Goldsmith, 1995)

Debe tenerse cuidado especial con los asados de costillas, chuletas y chorizos de cerdo, que no siempre se cuecen lo suficiente. El ahumado, salazón o desecación de la carne de cerdo no son métodos seguros para matar las larvas. (Chester, 1990; Ancha, 1989)

Deben emprenderse campañas educativas para informar al público en general sobre el peligro de la triquinosis, su forma de transmisión y la necesidad de cocer bien la carne de puerco, hasta que su color rosa se vuelva gris pardusco. (Brown, 1985)

El propósito debe ser el de reducir y, finalmente, erradicar la infección de los cerdos, cuya carne es la principal fuente de infección para el ser humano. La obligación es someter al calor (100°C) residuos de cocina o de mataderos destinados a la crianza de los cerdos. Sin embargo, la supervisión del cumplimiento de esta reglamentación es muy difícil y, por lo tanto, sus resultados no siempre son satisfactorios. (Ancha, 1989)

La erradicación final de la triquinosis en el hombre depende de su eliminación en el cerdo, lo cual puede lograrse en buena parte esterilizando los desperdicios que contienen trozos de carne cruda. (Bada, 1986)

El problema de la triquinosis reside en las pequeñas propiedades campesinas, donde se mantienen algunos cerdos y se les alimenta con desperdicios domiciliarios o de restaurantes. Estas fincas son muy difíciles de supervisar, y en ellas el sacrificio de los cerdos lo efectúa el propietario, sin inspección veterinaria. (Ancha, 1989)

Los métodos de control más eficaces contemplan eliminar la alimentación de cerdos con desperdicios sin procesar, mantener a los cerdos en corrales protegidos de las ratas, y hacer una cocción a fondo o la congelación a temperaturas bajas de todos los productos cárnicos que están destinados al consumo humano. También debe tenerse cuidado en evitar la contaminación de la carne de res al mezclarse esta con la de puerco, o al utilizar la misma máquina para la molienda de ambas. (Chester, 1990; Goldsmith, 1995)

Considerando lo mencionado anteriormente es evidente que para detectar y controlar las fuentes de infección de *T. spiralis*, es necesario contar con métodos serológicos específicos y sensibles, los cuales empleen antígenos exclusivos del parásito tales como los de superficie/estocoma o de excreción/secreción, como se mencionó anteriormente. (Yépez-Muliá, 1994)

# **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La triquinosis es un problema de salud pública en México pues, ocupa el 5° lugar de importancia en cuanto a las enfermedades transmisibles por alimentos reportadas al Instituto Nacional de Enfermedades Epidemiológicas (INDRE), además provee de un buen modelo para el estudio de infecciones helmínticas, en general.

En México, el diagnóstico de la triquinosis porcina cuando se practica se hace por la técnica de triquinoscopia o por digestión artificial. La primera es de baja sensibilidad, ya que, se reportan muchos falsos negativos. La segunda es, aunque más sensible, poco práctica debido al tiempo prolongado en el que se lleva a cabo; por lo que infecciones leves o tempranas pasan desapercibidas.

El diagnóstico serológico es una alternativa viable ya que si se cuenta con una técnica sensible, específica y de fácil aplicación con un antígeno adecuado, como lo podría ser el de Excreción-Secreción de larvas de *Trichinella spiralis*, ésta podría utilizarse en la inspección sanitaria en nuestro país y así detectar oportunamente a los cerdos infectados para impedir que la carne de estos animales sea consumida por la población, abatiendo de esta manera los casos de triquinosis.

Una de las técnicas que consideramos cubre los requisitos anteriores, es el Dot-ELISA; ya que es una prueba que imita a la IET obteniéndose una especificidad similar y además retiene la simplicidad del ELISA convencional.

## **OBJETIVOS**



## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluación del antígeno de Excreción-Secreción de larvas infectivas de *Trichinella spiralis* con las técnicas de Dot-ELISA e Inmunoelectrotransferencia (IET) para el serodiagnóstico de triquinosis porcina.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Estandarizar las técnicas de Dot-ELISA e IET para el diagnóstico de triquinosis porcina, utilizando antígeno de Excreción-Secreción.

Caracterizar antigénicamente los productos de Excreción-Secreción, determinando los componentes que son reconocidos por los sueros de cerdos experimentalmente infectados, mediante la técnica de IET.

Valorar las posibles reacciones cruzadas de estas pruebas con sueros de cerdos parasitados con *Ascaris suum*.

Realizar una comparación de los resultados obtenidos en ambas técnicas para evaluar la potencia diagnóstica del Dot-ELISA en la triquinosis porcina.

# HIPOTESIS

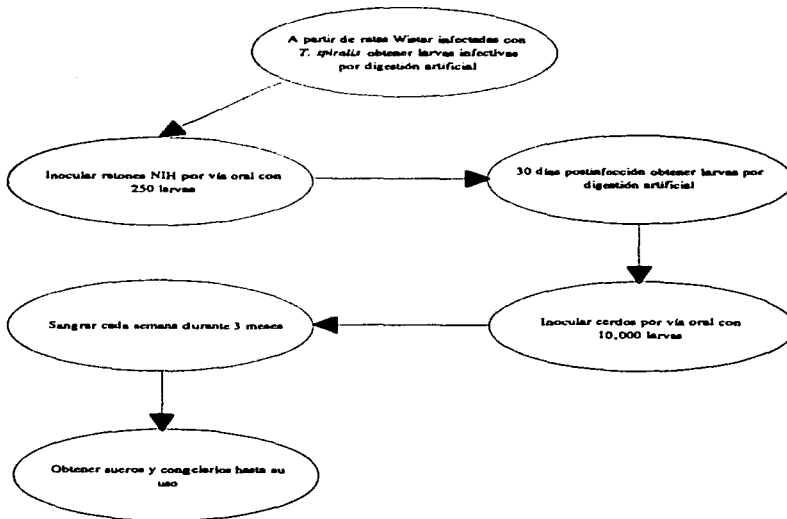
El antígeno de Excreción-Secreción de larvas infectivas de *T. spiralis* es un buen candidato para la implementación de la técnica de Dot-ELISA en el diagnóstico de la triquinosis porcina; obteniéndose una buena sensibilidad y especificidad, en comparación con la técnica de IET.

A su vez, tener una técnica de fácil aplicación e interpretación a nivel de campo.

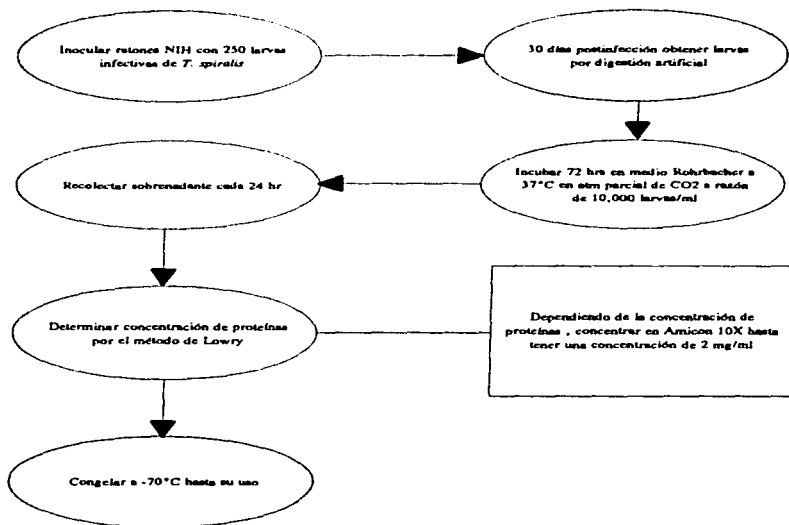
# **METODOLOGIA GENERAL**

## Parte I

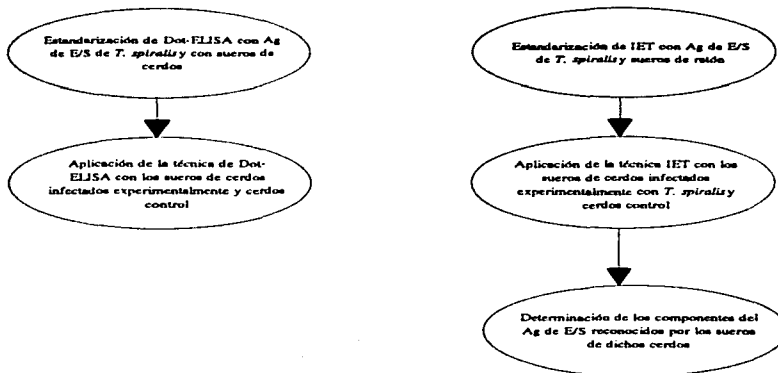
### Obtención de sueros problema



## Obtención del antígeno de E/S



## **Estandarización y aplicación de las técnicas de Dot-ELISA e IET**



## **MATERIAL Y EQUIPO**

### **Equipo**

- ⊙ Cámara para electroforesis (BIO-RAD)
- ⊙ Cámara para electrotransferencia (BIO-RAD)
- ⊙ Fuente de poder (BIO-RAD)
- ⊙ Potenciómetro (CORNING, M-103)
- ⊙ Espectrofotómetro (Coleman 6/20)
- ⊙ Microscopio electrónico (Carlzeiss)
- ⊙ Microscopio invertido (NIKON, TYPE 104)
- ⊙ Balanza analítica y granataria
- ⊙ Micropipetas automáticas
- ⊙ Campana de flujo laminar (ALDER)
- ⊙ Centrífuga (SOLBAT)
- ⊙ Microcentrífuga
- ⊙ Estufa de CO<sub>2</sub> (NAPCO)
- ⊙ Tanque de CO<sub>2</sub>
- ⊙ Concentrador de proteínas (AMICON)
- ⊙ Congelador de -70°C (REVCO )
- ⊙ Jeringa Hamilton
- ⊙ Agitadores magnéticos
- ⊙ Baño María



## **Material de uso común en el laboratorio**

- ⊗ Pipetas graduadas
- ⊗ Pipetas Pasteur
- ⊗ Vasos de precipitado
- ⊗ Matraces Erlenmeyer
- ⊗ Tubos de ensayo
- ⊗ Probetas
- ⊗ Frascos ambar y transparentes
- ⊗ Embudos

## **Otros materiales**

- ⊗ Tubos Eppendorf
- ⊗ Gradillas
- ⊗ Botellas para cultivo
- ⊗ Filtros con membrana de 22 $\mu$ m
- ⊗ Cámara cuentanemátodos
- ⊗ Jeringas estériles
- ⊗ Guantes desechables
- ⊗ Papel filtro de poro abierto y cerrado
- ⊗ Membrana para AMICON de 25 KDa
- ⊗ Mallas del No. 40, 100 y 200

## **Material Biológico**

- ⊗ Cepa de *Trichinella spiralis* del Departamento de Parasitología de la ENCB

- ⊗ Ratones adultos hembras de la cepa NIH
- ⊗ Antígeno de Excreción-Secreción
- ⊗ Cerdos de dos meses de edad de la cepa tipo York
- ⊗ Sueros de cerdos parasitados con *T. spiralis*
- ⊗ Sueros de cerdos parasitados con *A. suum*

## REACTIVOS

- ⊗ Conjugado con peroxidasa anti-ratón (SIGMA)
- ⊗ Conjugado con peroxidasa anti-cerdo (SIGMA)
- ⊗ Acrilamida (SIGMA)
- ⊗ Bis acrilamida (SIGMA)
- ⊗ Trizma base (SIGMA)
- ⊗ Acido clorhídrico (MERCK)
- ⊗ Hidróxido de sodio (MERCK)
- ⊗ Dodecil sulfato de sodio (SDS) (SIGMA)
- ⊗ Persulfato de amonio (GIBCO BRL)
- ⊗ -N-N-N-tetrametiletildiamino (TEMED) (SIGMA)
- ⊗ Glicina (MERCK)
- ⊗ Glicerol (MERCK)
- ⊗ Azul de bromofenol (MERCK)
- ⊗ Azul de Coomassie R-250 (MERCK)
- ⊗ Metanol absoluto (MERCK)
- ⊗ Acido acético glacial (MERCK)

- ⊙ 2-β-mercaptoetanol (MERCK)
- ⊙ EDTA tetrasódico (Químicos Monterrey)
- ⊙ 4-α-cloro-naftol (SIGMA)
- ⊙ Pepsina (SIGMA)
- ⊙ Peróxido de hidrógeno al 30% (BAKER)
- ⊙ Marcadores de peso molecular (SIGMA)
- ⊙ Papel de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro (SIGMA)
- ⊙ Fosfato monobásico de potasio (Químicos Monterrey)
- ⊙ Fosfato dibásico dodecahidratado (Químicos Monterrey)
- ⊙ Cloruro de potasio (MERCK)
- ⊙ Cloruro de sodio (MERCK)
- ⊙ Tween 20 (SIGMA)
- ⊙ Carbonato de sodio (Químicos Monterrey)
- ⊙ Sulfato de cobre pentahidratado (J.T.Baker)
- ⊙ Tartrato de sodio y potasio (Químicos Monterrey)
- ⊙ Reactivo de Fólín (SIGMA)
- ⊙ Amido negro (MERCK)
- ⊙ Carbón activado
- ⊙ Tinta china (Stafford)
- ⊙ Albúmina bovina fracción V (ICN Biochemicals)
- ⊙ Albúmina bovina total (SIGMA)
- ⊙ Citrato de sodio (MERCK)
- ⊙ Glucosa (Químicos Monterrey)
- ⊙ EDTA (Químicos Monterrey)
- ⊙ PMSF (Fluoruro de fenil-metil-sulfonil) (SIGMA)

⊙ TLCK (N-Tosyl-lisil-clorometil-cetona) (SIGMA)

⊙ TPCK (L-1-Tosylamida-2-fenil-etilclorometil-cetona) (SIGMA)

## PROCEDIMIENTOS

### Obtención del inóculo infectante de *Trichinella spiralis*

A partir de la cepa de *Trichinella spiralis*, la cual se mantuvo exclusivamente en ratas de la cepa Wistar, se inocularon por vía oral 30 ratones hembras adultos de la cepa NIH, con 250 larvas infectivas localizadas en masa muscular por vía intragástrica.

A un mes post-infección, los ratones se sacrificaron para la obtención de la masa muscular, la infección se comprobó por el método de compresión (Mazzotti y Chavira, 1943) a través de un microscopio estereoscópico; se observaron fragmentos del músculo diafragmático.

Por medio de un molino para carne, se trituró la masa muscular y se colocó en dos matraces Erlenmeyer de 2 L conteniendo 1 L de solución digestora artificial y se mantuvo con agitación constante mediante inyección de aire a 37°C en baño María, por 24 horas.

La suspensión digerida se pasó a través de tamices de 40, 100 y 200 mallas de diámetro, colectando el total de las larvas en el tamiz de 200; se lavaron con PBS y mediante sedimentación se colectaron hasta observarlas libres de tejido muscular

Se realizó la cuenta de larvas en una cámara cuantanamátodos.

### Obtención del antígeno de Excreción-Secreción

Las larvas musculares obtenidas mediante digestión artificial se lavaron tres veces mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. Los primeros 2 lavados se realizaron con 5 ml de PBS pH 7.2, y un tercero con 2 ml de antibiótico penicilina-estreptomicina con una concentración de 100X; el concentrado de las larvas se transfirió a una botella de cultivo celular, conteniendo medio de mantenimiento Rohrbacher (Rohrbacher G., 1957), a una proporción de 10,000 larvas por ml de medio. Se adicionó penicilina-estreptomicina a razón de 100 µl por cada 10 ml de medio, al igual que los inhibidores de proteasas (TPCK, TLCK y PMSF); excepto el EDTA que se colocó a razón de 67 µl por cada 10 ml de medio.

Se incubó en una estufa a 37°C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Se realizaron cosechas a las 24, 48 y 72 horas, filtrando cada cosecha a través de una membrana de 22 µm en condiciones de esterilidad.

### **Concentración del antígeno**

El volumen final del antígeno se midió y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col. 1951).

Con el fin de obtener una concentración final de proteínas de 2 mg/ml se realizó una concentración del antígeno en AMICON 10X, utilizando una membrana de 25 kDa.

A este concentrado se le realizó una determinación de proteínas por Lowry ( Lowry y col., 1951).

Por último, el antígeno se colocó en tubos eppendorf con 400 µl cada uno, los cuales fueron almacenados a -20°C por 24 h y posteriormente a -70°C.

### **Infección experimental de cerdos con *Trichinella spiralis***

A partir de larvas obtenidas por digestión artificial, se infectaron con 10,000 larvas, por vía oral, un lote de cerdos de dos meses de edad limpios de cualquier otra infección

### **Colecta de sueros positivos**

Se obtuvieron muestras sanguíneas de los cerdos infectados, cada semana, durante 10 semanas y se colectó el suero, el cuál se almacenó a -70°C hasta su uso.

Se comprobó la parasitosis en los animales sacrificados mediante la técnica de triquinoscopia, observándose 10 larvas/g de músculo.

### **Colecta de sueros testigo**

Se obtuvo una muestra sanguínea de cerdos limpios ( se corroboró el estado del cerdo mediante un análisis coproparasitológico).

Se obtuvieron muestras sanguíneas diversas de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*; la cual se comprobó mediante un análisis coproparasitológico y la técnica de IET.

Se obtuvo el suero y se conservó a -70°C.

## **Evaluación del antígeno de Excreción-Secreción**

Se evaluó la sensibilidad y especificidad del antígeno mediante las técnicas de Dot-ELISA e IET, utilizando sueros de animales limpios, de animales infectados con *T. spiralis* y de animales infectados con *A. suum*.

## **Identificación de los componentes del antígeno de Excreción-Secreción útiles en el diagnóstico**

El antígeno de Excreción-Secreción se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirió a papel de nitrocelulosa, se puso a reaccionar con los tres tipos de suero anteriormente mencionados. El revelado de la reacción se realizó mediante ELISA.

## **INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

### **Fundamento**

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET), descrita por Towbin y col. en 1979, es uno de los métodos más útiles con que se cuenta para el análisis antigénico (Peferoen, 1982).

La IET combina el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia o ausencia de detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS), con la reacción antígeno-anticuerpo en fase sólida. En el primer caso, bajo las condiciones empleadas las proteínas se separan de acuerdo a sus pesos moleculares, lo que permite su identificación.

Posteriormente, las proteínas así separadas son electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa (NC) o de nylon, en donde se unen a los grupos reactivos de éstas, quedando inmobilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón que se obtiene sobre el papel es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Es necesario en esta fase del procedimiento bloquear los sitios reactivos del papel que quedan libres con alguna proteína que no interfiera (por ejemplo, gelatina, albúmina sérica bovina o leche), para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos que se emplean a continuación. En la siguiente etapa, la membrana de NC se hace reaccionar con los anticuerpos

problema, los cuáles podrán unirse a sus antígenos correspondientes inmovilizados en el papel (Burnette, 1981).

La reacción antígeno-anticuerpo que se efectuá corresponde a la primera etapa de la reacción (no se requiere la formación de mallas de precipitado, lo cual hace la técnica altamente sensible). Para ponerla de manifiesto se puede agregar un segundo anticuerpo unido a una enzima como peroxidasa o bien protefna igualmente marcada. En el ensayo enzimático se agrega el sustrato y un cromógeno que participe *in situ* para hacer visible la reacción. Dependiendo del tipo de reactivo inmunológico que se emplee para hacer visible la reacción se puede identificar la clase de respuesta inmunológica del huésped (IgM, IgG, IgA, IgE) (O'Sullivan, 1979).

## Procedimiento

Preparación de la cámara de electroforesis:

1. Se lavaron las placas de vidrio perfectamente antes de montarse.
2. De acuerdo al siguiente cuadro se prepararon el gel separador al 10% de poliacrilamida y el gel concentrador.

	Gel de poliacrilamida al 10%	Gel Concentrador
Agua desionizada (ml)	6.5	6.1
Bis-acrilamida (ml)	5.2	1.3
Tris pH 8.8 (ml)	3.3	2.5
SDS 10% (μl)	130	100
PSA 10% (μl)	65	50
TEMED (μl)	65	30

3. Una vez preparado el gel separador se vertió la mezcla entre las dos placas de vidrio dejando un marco de 3 cm del borde superior.
4. Polimerizado el gel separador, se colocó el peine de forma inclinada, de tal manera que por un extremo se adicionó la solución del gel concentrador.
5. Se agregó la mezcla del gel concentrador sobre el gel separador y se introdujo completamente el peine (cuidando de que no se formen burbujas en la interfase de los dos geles).
6. Una vez polimerizado el gel concentrador, se retiró el peine con cuidado, se enjuagaron los pozos con agua y después se secaron con tiritas de papel filtro.

7. Las placas se colocaron en la cámara y se llenó con el regulador de electroforesis.

8. Preparación de muestras; las muestras se mezclaron vol/vol (300µg/150µl) con la solución desnaturizante (si se requiere romper enlaces disulfuro se usa 10 µl de 2-mercaptoetanol por cada ml de solución). Se sometieron las muestras a ebullición bien selladas por 5 min en baño María.

9. Las muestras se colocaron en los carriles (se recomienda que en el primer carril se coloque el estándar de peso molecular).

10. Después de colocadas las muestras se llenaron los pocitos vacíos con el mismo regulador de corrimiento.

11. Por último se llenó la cámara interna con el regulador de corrimiento.

12. Se colocaron los cables en el aparato y en la fuente de poder.

Se ajustó a 100 volts constantes durante 1 h y posteriormente a 150 volts. Hay que mantener el corrimiento hasta que el azul de bromofenol llegue a medio cm del final de la placa.

13. Terminándose el corrimiento se sacó el gel.

Si se quiere hacer la tinción de proteínas con azul de Coomassie se coloca el gel en un recipiente con el colorante procurando que cubra todo el gel, se deja reposando toda la noche a temperatura ambiente, se elimina el colorante (puede ser reusado si después de cada uso se filtra con el papel Whatman #1) y se agrega el decolorante 1. Se hacen cambios necesarios hasta lograr la nitidez adecuada de las bandas; por último se agrega el decolorante 2 para que el gel recobre su tamaño original.

**NOTA:** Si el gel va a ser transferido no se tiñe con azul de Coomassie.

Se procede como se indica a continuación :

### **Preparación de la cámara de ELECTROTRANSFERENCIA**

1. En un recipiente con suficiente regulador de transferencia se humedecieron las fibras scotch y los filtros 15 min antes de transferirse.

2. Se cortó la membrana de NC de acuerdo al tamaño del gel (utilizando guantes); se colocó la membrana en otro recipiente conteniendo regulador de transferencia.



3. En un cassette de la cámara de electrotransferencia se colocó primero una fibra scotch. Sobre la fibra se colocaron dos porciones de papel filtro teniendo cuidado de no dejar burbujas atrapadas entre los papeles, después se colocó el gel y sobre él, la membrana de NC eliminando las burbujas. Con un lápiz se marcó el frente del corrimiento del gel y se señaló el carril #1 de acuerdo a la colocación de las muestras; se colocaron nuevamente otros dos papeles filtros sobre la membrana de NC y por último la otra fibra. Se cerró el cassette y se insertó en el contenedor.

4. Se colocó el contenedor en la cámara de transferencia y se llenó con el regulador, se tapó y se conectaron los electrodos de tal manera que el ánodo quedó del lado del gel; se conectaron a la fuente de poder y se transfirió durante 3 h a 25 AMP.

5. Al término de la transferencia, se tomó la membrana de NC (con guantes) y se cortó una tira la cual se colocó en un recipiente con negro de amido para detectar las proteínas transferidas. Cuando se observaron las bandas se retiró el exceso del colorante y se cortó el pedazo de membrana donde estaban los marcadores de PM, se dejó secar al aire libre y se guardó para su posterior utilización.

6. El resto de la membrana de NC se colocó en un recipiente con suficiente regulador de bloqueo (albúmina bovina al 3% en PBS) y se dejó incubando toda la noche a 4°C.

7. Pasado el periodo de incubación con el bloqueador se hicieron tres lavados con PBS-Tween 5 min cada uno, después dos lavados con PBS sin tween, 5 min cada uno; los lavados se realizaron con agitación continua.

8. La membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras de aproximadamente 0.5 cm y se dejó incubando con los sueros problema durante toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.

9. Se hicieron tres lavados con PBS-tween, 5 min cada uno, y 3 lavados con PBS sin tween 5 min cada uno.

10. Posteriormente se agregó el conjugado anti-IgG de cerdo-peroxidasa a la dilución apropiada (1:250 con PBS) se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación continua.

11. Se hicieron 3 lavados con PBS-tween, 5 min cada uno, y 3 lavados con PBS sin tween, 5 min cada uno.

12. Por último se agregó el sustrato de la peroxidasa y se espero hasta que aparecieron las bandas (1,4-cloronaftol).

13. Determinación de pesos moleculares: Se calcula el Rf de cada uno de los marcadores de peso molecular.

$$Rf = \frac{\text{Distancia de la parte superior del gel separador a la banda}}{\text{Distancia de la parte superior del gel separador al frente del azul de bromofenol}}$$

Se grafica el Rf contra el log del peso molecular para cada proteína conocida y se obtiene una relación lineal. Se calcula el Rf de cada proteína en el problema y se interpola en la gráfica para determinar su peso molecular.

## **DOT-ELISA (Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay).**

### **Fundamento**

Existe un gran número de variantes para el ELISA, debido a su alta sensibilidad y especificidad, así como por su fácil ejecución. Una de las más populares es el Dot-ELISA, también conocida como inmunopunto o Dot-blot, en el cual se emplea una membrana de nitrocelulosa como soporte para el acoplamiento del antígeno o el anticuerpo (Hawkes, 1986).

En el presente estudio, el Dot-ELISA fue usado para detectar anticuerpos contra *T. spiralis* en cerdos infectados experimentalmente.

La interacción antígeno-anticuerpo se hace visible con un antisuero marcado con peroxidasa; poniéndose de manifiesto al adicionar un sustrato (peróxido de hidrógeno).

El sitio donde se hace visible la reacción se lleva a cabo mediante el desarrollo de un color café (Pappas et. al., 1983,1984). La lectura se realiza visualmente por comparación con los testigos positivo y negativo.

La estandarización de la técnica se realizó con la evaluación de los siguientes factores:

- a) Concentración óptima del Ag de E/S de *T. spiralis*
- b) Dilución óptima de los sueros problema
- c) Tiempos de incubación
- d) Temperatura de incubación
- e) Dilución de anti-gammaglobulina (anti IgG de cerdo)
- f) Tiempo de lectura

Estandarizada la técnica se procedió a probar los sueros problemas así como sueros de cerdos infectados naturalmente con otros parásitos utilizando Ag de E/S.

### **Procedimiento**

1. La membrana de NC se sometió durante 5 min a una solución de PBS 1X. Una vez embebidas se sacaron las tiras y se colocaron sobre un papel absorbente para quitar el exceso de PBS.
2. Con la ayuda de un jeringa Hamilton se acoplaron a la membrana de NC 10  $\mu$ g o sea 6 $\mu$ l del Ag de E/S.
3. Se dejó secar por 30 min a temperatura ambiente.
4. Se realizó un lavado con PBS 1X.
5. Se bloquearon los sitios reactivos libres de la membrana de NC con 2 ml de leche Svelty al 5% en PBS por 30 min a temperatura ambiente con agitación continua.
6. Se repite el paso 4.
7. Cada tira se incubó con un suero problema (dilución 1:80), durante 30 min a temperatura ambiente con agitación continua.
8. Se repite el paso 4.
9. Se realizó una incubación con el conjugado anti IgG de cerdo-peroxidasa, diluido 1:250 en PBS, durante 30 min a temperatura ambiente, con agitación constante.
10. Se repite el paso 4.
11. El complejo formado en la membrana se hizo reaccionar con la solución cromógeno/sustrato (DAB).
12. Se agregaron 25  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30%. La aparición de un tono café reveló una reacción positiva. La reacción se detuvo con agua desionizada y la membrana se dejó secar.

## **DISEÑO DE INVESTIGACION**

El diseño de investigación que se aplicó al presente trabajo fue un estudio de tipo prospectivo, comparativo, longitudinal y observacional.

### **Población**

Cerdos hembras de dos meses de edad, de la cepa tipo York.

### **Criterios de inclusión**

Cepa de *Trichinella spiralis*

Cerdos de dos meses de edad

Cerdos hembras, cepa tipo York

Los animales de experimentación deben estar libres de cualquier parasitosis

Sueros de cerdo infectados experimentalmente con *T. spiralis*

Sueros de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*

Sueros de cerdos de traspatio

### **Variable**

La técnica de Dot-ELISA

Técnica de Inmunoelctrotransferencia

Antígeno de excreción-secreción de *T. spiralis*

(Mendez R. et al., 1990)

## **DISEÑO ESTADÍSTICO**

### **Sensibilidad y especificidad.**

La sensibilidad y especificidad son dos características útiles para validar la exactitud de las pruebas.

La sensibilidad es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad, y se representa como  $P(+/E)$  (probabilidad,  $P$ , de que la prueba sea positiva,  $+$ , dado,  $/$ , que el individuo está enfermo,  $E$ ).

La especificidad es la probabilidad de que la prueba sea negativa cuando el individuo realmente no tiene la enfermedad y se representa como  $P(-/E')$  (probabilidad,  $P$ , de que la prueba sea negativa,  $-$ , dado,  $/$ , que el individuo no está enfermo,  $E'$ ).

### **Procedimiento nosológico**

Se usa para validar una prueba comparándola con una prueba de referencia muy exacta. Este procedimiento consiste en aplicar la prueba de diagnóstico a un grupo de individuos que se sabe, por una prueba de referencia, que realmente están enfermos del padecimiento en estudio y a otro grupo de individuos que se sabe no tienen dicho padecimiento.

Para calcular las características de sensibilidad y especificidad es necesario elaborar una tabla de contingencia.

**TABLA DE CONTINGENCIA ESTADISTICA  
TEOREMA DE BAYES**

<b>PRUEBA DE DIAGNOSTICO</b>	<b>PRUEBA DE REFERENCIA</b>			
		<b>PARASITADOS</b>	<b>SANOS</b>	<b>TOTAL</b>
	<b>POSITIVOS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>A + B</b>
	<b>NEGATIVOS</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>C + D</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>A + C</b>	<b>B + D</b>	<b>A+B+C+D</b>

**A = NUMERO DE CASOS VERDADEROS POSITIVOS**  
**B = NUMERO DE CASOS FALSOS POSITIVOS**  
**C = NUMERO DE CASOS FALSOS NEGATIVOS**  
**D = NUMERO DE CASOS VERDADEROS NEGATIVOS**

**( MENDEZ, I.R.,1986)**

**Valor predictivo positivo ( V.P.P.)**

Probabilidad de que la prueba salga positiva cuando realmente se tiene el padecimiento.

**Valor predictivo negativo ( V.P.N.)**

Probabilidad de que la prueba salga negativa cuando realmente no se tiene el padecimiento.

**Indice de falsos positivos ( I.F.P.)**

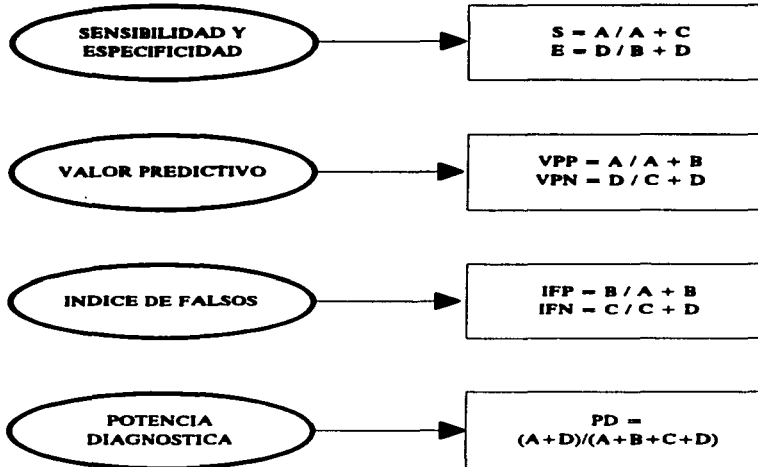
Probabilidad de que la prueba salga positiva cuando realmente no se tiene el padecimiento.

**Indice de falsos negativos ( I.F.N.)**

Probabilidad de que la prueba salga negativa cuando realmente se tiene el padecimiento.

(Casimiro M., 1987)

## FORMULAS ESTADISTICAS APLICADAS





**RESULTADOS  
Y  
DISCUSION**

En el presente estudio se evaluó la utilización de los componentes de excreción-secreción de la larva muscular de *T. spiralis* en el diagnóstico de la triquinosis en cerdos infectados experimentalmente.

El antígeno de excreción-secreción de *T. spiralis* obtenido y concentrado presentó 2.0 mg/ml de proteína como concentración final; la concentración utilizada de este antígeno para la técnica de IET fue de 300µg y para el Dot-ELISA de 10µg.

Con objeto de determinar cuales componentes de la larva muscular eran importantes para el diagnóstico, se infectaron cerdos experimentalmente con 10,000 larvas de *T. spiralis* y se tomaron muestras de suero antes y semanalmente después de la infección a lo largo de diez semanas.

Así de esta manera y utilizando la técnica de Inmunoelectrotransferencia se observó que siete componentes con pesos moleculares de 229, 108, 64, 45, 41, 40 y 33-38.5 KDa eran reconocidos por los cerdos infectados (Tabla 4).

Recientemente, Arriaga y cols. en 1992 y Yépez-Muliá en 1995; identificaron varios componentes de superficie/esticosoma de *T. spiralis* que son reconocidos por sueros de cerdos infectados; los cuales corresponden a pesos moleculares de 105, 72, 67, 52 y 47 KDa. Asimismo, Chan y cols. en 1988 describieron un antígeno que emigró a un peso molecular de 45 KDa, el cual de acuerdo a su antigenicidad y predominancia asumen que es idéntico al antígeno de 47 KDa descrito anteriormente. Asimismo, nuestros resultados presentan también un componente de 45 KDa que coincide con los dos mencionados anteriormente.

Las diferencias en pesos moleculares de estos componentes, pueden ser atribuidas al uso de diferentes marcadores; así como a las diferencias considerables entre los métodos utilizados, ésto es explicable si nos enfocamos a las condiciones ambientales y de equipo bajo las cuales se realizaron las pruebas, ya que cuando se lleva a cabo la estandarización de alguna técnica se presentan diversos problemas, así en este estudio uno de ellos fue el poder obtener la gelificación de los geles.

Además la presencia de bandas de peso molecular por encima o por debajo de las reportadas en la bibliografía, es razonable si vemos que los productos de excreción-secreción de la larva muscular se trabajaron como un pool, ya que debido tanto a la concentración como al volumen obtenido finalmente de antígeno las cosechas de 24, 48 y 72 h se mezclaron para ser concentrados en AMICON 10X y así obtener la concentración adecuada para llevar a cabo la realización de las técnicas. Por otro lado, en uno de los estudios realizados por Despommier se recomienda que los productos de excreción-secreción de la larva muscular sean obtenidos en tiempos cortos (menos de 24 h); ya que fuera de este tiempo los gusanos pierden su infectividad y empiezan a morir, lo cual puede darnos una combinación de antígenos de excreción-secreción y otros productos de desechos pertenecientes a la cutícula de la larva; sin embargo, la presencia de estos componentes en nuestro caso particular no causaron ninguna interferencia en los resultados obtenidos.

TABLA 4

**PESO MOLECULAR (KDa) DE LOS COMPONENTES DEL Ag DE E/S RECONOCIDOS POR SUEROS DE CERDOS POSITIVOS A *T. spiralis***

*MPM	Ag de E/S
	229
180	
116	108
84	64
58	
48.5	45
	41
	40
36.5	
26.6	33 - 38.5

\*MPM Marcadores de peso molecular

En cuanto al patrón de reconocimiento antigénico de *T. spiralis*, podemos ver que se presentó a la cuarta semana post-infección en el cerdo No.1 ( Fig. 7), a diferencia de los cerdos 2 y 3 ( Figs. 8 y 9) donde el patrón antigénico se observó a la quinta semana post-infección.

Estas diferencias en las reacciones son causadas por factores tales como una ausencia o un bajo nivel de anticuerpos en circulación como consecuencia de un retraso de tiempo entre los períodos en los cuales los parásitos se instalan en músculo y desarrollan anticuerpos

demostrables. Aunado a esto, tanto el estado nutricional del cerdo como su baja respuesta inmunológica a nivel intestinal comprometen la capacidad de producción de niveles de anticuerpos detectables; además de que infecciones recurrentes pueden tener un efecto supresor en la respuesta inmune a la infección de *T. spiralis* ( Murrell, 1986).

Cabe hacer notar que aunque se redujeron grandemente las reacciones inespecíficas al utilizar el antígeno de excreción-secreción, se detectó una reacción cruzada causada por anticuerpos contra la glicoproteína de 45 KDa, esto puede ser explicado por la presencia de epítopes compartidos entre *T. spiralis* y otros parásitos comunes en los cerdos como *Ascaris suum* y *Trichuris suis* ( Fig. 10).

A este respecto, Wieger y cols. en 1991, quienes también observaron una reacción cruzada entre el antígeno de 47 KDa explican que esto se debe a la presencia del antígeno de 37 KDa, que es común en varios nemátodos y que coemigra con el antígeno de 45 KDa al reducir las condiciones electroforéticas.

Por último, podemos decir que mediante un análisis de Inmunoelctrotransferencia se comprobó que los componentes de la larva muscular con peso molecular entre 45 y 108 KDa encontrados en el presente estudio y los de 47 y 105 KDa descritos por Arriaga y cols., Wieger y cols., Gamble y Despommier son los principales antígenos reconocidos por los cerdos infectados.

En el presente estudio la prueba de DOT-ELISA mostró una sensibilidad y especificidad similar a la obtenida mediante la prueba de Inmunoelctrotransferencia tal y como lo reportaron Su y Prestwood ( Su y Prestwood, 1991).

En contraste con los resultados obtenidos por Wieger y cols., quienes encontraron que en el Dot-ELISA utilizando el antígeno de excreciones-secreciones no desnaturalizado, no correspondía con los obtenidos en la Inmunoelctrotransferencia, y que para obtener una similitud, la cantidad de antígeno tenía que incrementarse; en este trabajo se observó que no hay diferencia en los resultados de ambas técnicas al utilizar el antígeno sin desnaturalizar.

La identificación de los sueros positivos en las técnicas de IET y Dot-ELISA mostraron anticuerpos anti-*T. spiralis* muy semejantes, lo que corroboró que estos animales efectivamente estaban infectados con el parásito.

Un aspecto importante que hay que mencionar es que en este trabajo la detección de anticuerpos anti-*T. spiralis* mediante el Dot-ELISA se llevó a cabo a la semana 4 y 5 postinfección, y no hasta la 6 semana postinfección según resultados reportados por Su y Prestwood. ( Figs. 11,12 y 13).

Al realizar la evaluación de los cerdos de traspatio provenientes del estado de Aguascalientes y del Estado de México ( Figs. 14,15 y 16,17) se comprobó que el antígeno de excreciones-secreciones permite detectar de manera específica los cerdos infectados con *T. spiralis*, ya que hubo una asociación entre la negatividad obtenida en la técnica de Inmunoelctrotransferencia así como en el Dot-ELISA.

A diferencia de los datos reportados por González, 1988, y los obtenidos en la técnica de IET; donde se detectó una reacción cruzada con ascariasis ( Fig. 10), los resultados encontrados en el Dot-ELISA no coincidieron ( Fig. 18); sin embargo, esto puede ser evidentemente razonable si vemos que la prueba de IET no sólo determina una reacción positiva por la aparición de un color, sino, también presenta un perfil antigénico.

Así de esta manera, el epítoto compartido por ambos parásitos no se hace evidente en el Dot-ELISA, pues, en esta técnica hay reconocimiento de anticuerpos anti-*T. spiralis* pero hacia todo el antígeno, no sólo a una porción de él.

Al analizarse las muestras fecales y los sueros de cerdos de traspatio mediante un estudio coproparasitoscópico y la técnica de IET sólo 4 muestras de 22 sueros trabajados resultaron positivos hacia el nemátodo *Ascaris suum* lo que permitió determinar la existencia o no de reacciones cruzadas (Figs. 19 y 20).

Conviene aclarar que el utilizar solamente 4 sueros positivos hacia *A. suum* fue por el hecho de los inconvenientes que se tuvieron para conseguir las muestras, ya que como son cerdos de casa, la disponibilidad de la gente para permitir sangrar a sus cerdos es baja; además de que como se dijo anteriormente sólo 4 de 22 cerdos estaban infectados naturalmente con dicho parásito.

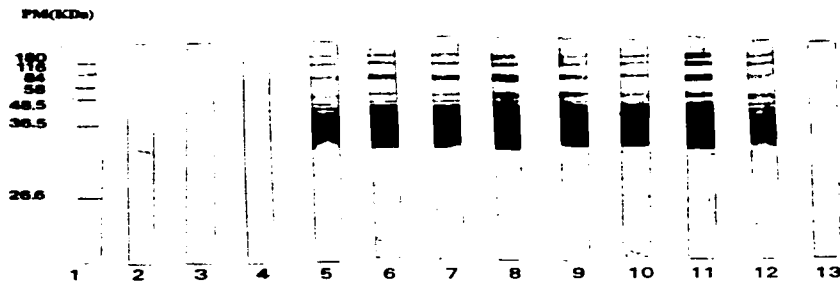
Los sueros restantes presentaron 2 bandas de pesos moleculares de 42.5 y 45 KDa, lo cual lo adjudicamos a reacciones cruzadas con otros parásitos ya que el examen coproparasitoscópico mostró que los cerdos de traspatio estaban parasitados con *Eimerias sp.*

Al realizar la comparación entre las técnicas de IET y Dot-ELISA, vemos que ambas confirman la presencia de anticuerpos hacia *T. spiralis* en cerdo. Sin embargo, la IET no cumple con los requisitos de una prueba ideal, ya que es muy cara y sofisticada.

Sin embargo, el Dot-ELISA es una técnica adecuada para implementarse en el campo y en los rastros del país, ya que su sensibilidad y especificidad es similar a la obtenida mediante la IET. Además de ser una prueba sencilla, y fácil de realizar no utiliza aparatos sofisticados para su lectura, pues los resultados pueden leerse visualmente. El ensayo es extremadamente económico, principalmente en cuanto a la cantidad de antígeno que se utiliza.

**Fig. 7**

**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por el cerdo No. 1  
mediante la técnica de IET**



1 Marcadores de peso molecular

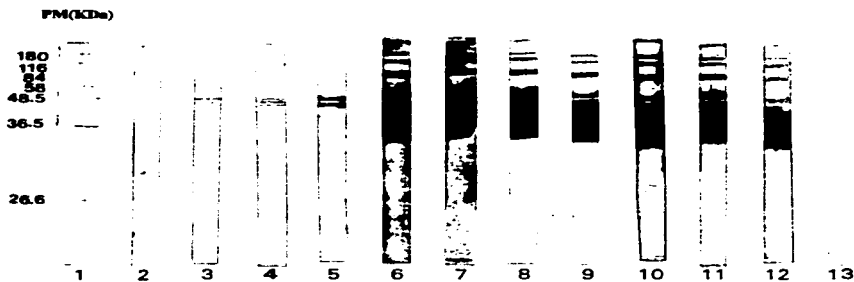
2 al 11 muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección

12 Testigo (+)

13 Testigo (-)

**Fig. 8**

**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por el cerdo No. 2  
mediante la técnica de IET**



1 Marcadores de peso molecular

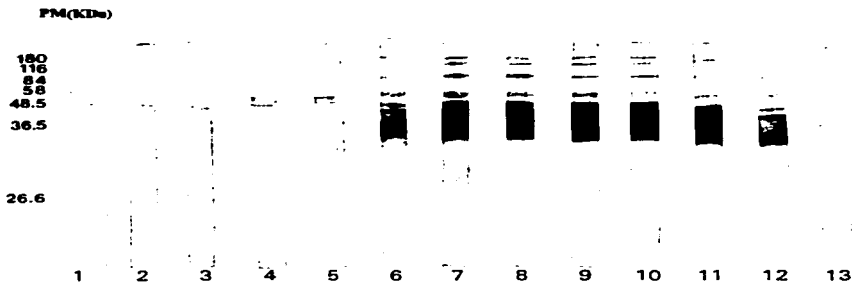
2 al 11 muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección

12 Testigo (+)

13 Testigo (-)

**Fig. 9**

**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por el cerdo No. 3  
mediante la técnica de IET**



1 Marcadores de peso molecular

2 al 11 muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección

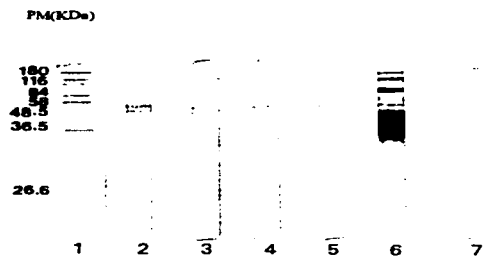
12 Testigo (+)

13 Testigo (-)



**Fig. 10**

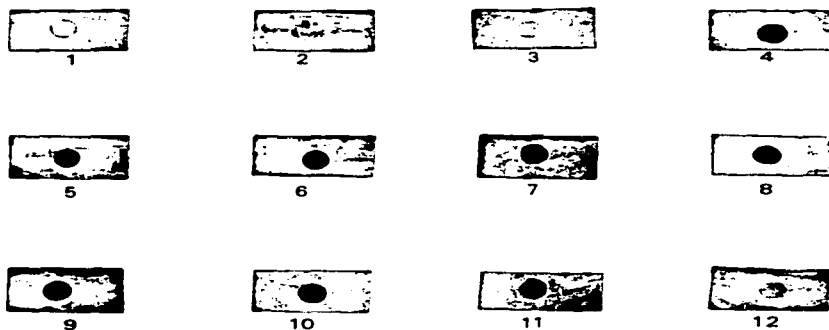
**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por sueros de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*, mediante la técnica de IET**



- 1 Marcadores de peso molecular  
2 al 5 Muestras de sueros de cerdos infectados con *A. suum*  
6 Testigo (+)  
7 Testigo (-)

**Fig. 11**

**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por el cerdo No. 1  
mediante la técnica de Dot-ELISA**



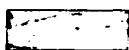
**1 al 10 Muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección**

**11 Testigo (+)**

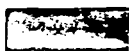
**12 Testigo (-)**

**Fig. 12**

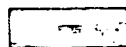
**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por el cerdo No. 2  
mediante la técnica de Dot-ELISA**



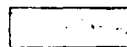
1



2



3



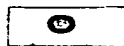
4



5



6



7



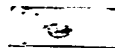
8



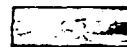
9



10



11



12

1 al 10 Muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección

11 Testigo (+)

12 Testigo (-)

**Fig. 13**

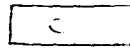
**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por el cerdo No. 3  
mediante la técnica de Dot-ELISA**



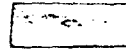
1



2



3



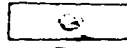
4



5



6



7



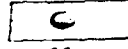
8



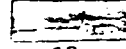
9



10



11



12

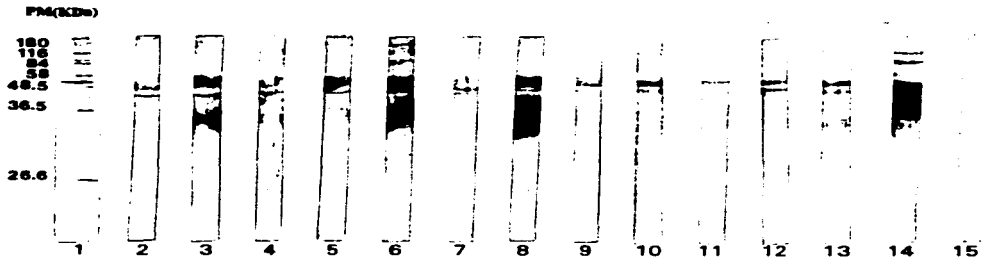
1 al 10 Muestras de suero tomadas de la primera a la décima semana post-infección

11 Testigo (+)

12 Testigo (-)

Fig. 14

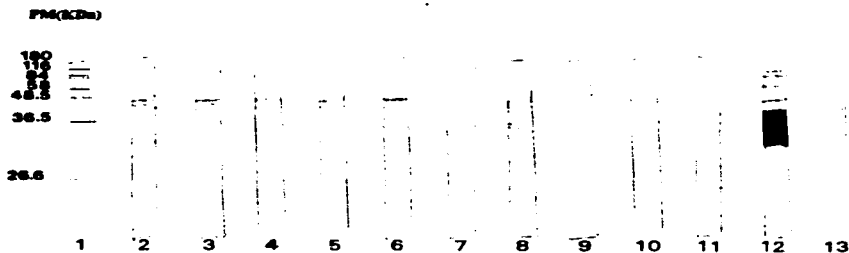
**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por sueros de cerdos de traspatio de Jesús María, Aguascalientes, mediante la técnica de IET**



- 1 Marcadores de peso molecular
- 2 al 13 muestras de suero de cerdos de traspatio
- 14 Testigo (+)
- 15 Testigo (-)

**Fig. 15**

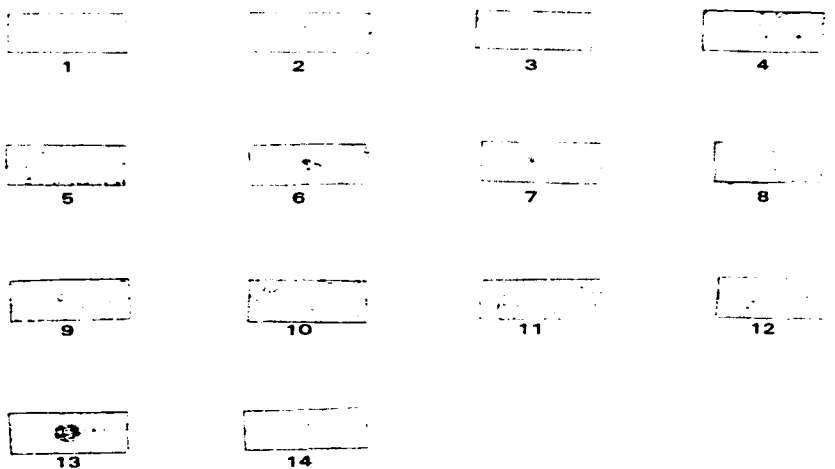
**Reconocimiento del Ag de E/S de *T. spiralis* por sueros de cerdos de traspatio de Jilotepec, Edo. de México, mediante la técnica de IET**



- 1 Marcadores de peso molecular
- 2 al 11 muestras de suero de cerdos de traspatio
- 12 Testigo (+)
- 13 Testigo (-)

**Fig. 16**

**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por suero de cerdos de traspatio de Jesús María, Aguascalientes, mediante la técnica de Dot-ELISA**



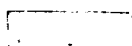
1 al 12 Muestras de suero tomadas de cerdos de traspatio

13 Testigo (+)

14 Testigo (-)

**Fig. 17**

**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por suero de cerdos de traspatio de Jilotepec, Edo. de México, mediante la técnica de Dot-ELISA**



1



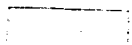
2



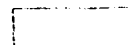
3



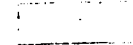
4



5



6



7



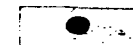
8



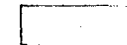
9



10



11



12

1 al 10 Muestras de suero tomadas de cerdos de traspatio

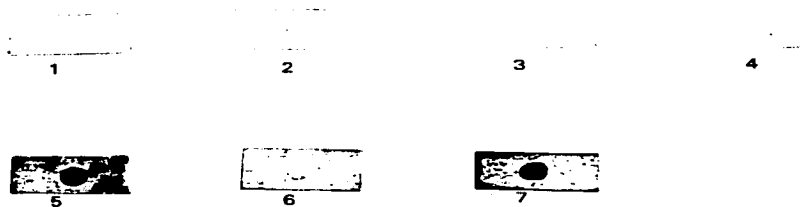
11 Testigo (+)

12 Testigo (-)



**Fig. 18**

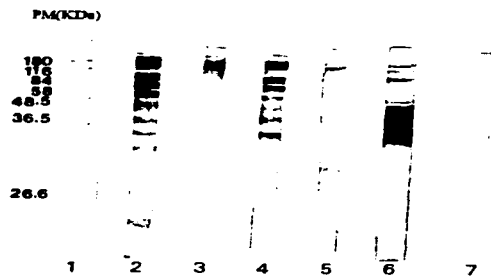
**Identificación de Abs anti-*T. spiralis* por suero de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*, mediante la técnica de Dot-ELISA**



- 1 al 4 Muestras de suero de cerdos con *A. suum*  
5 Testigo (+)  
6 Testigo (-)  
7 Testigo (+) de *A. suum*

**Fig. 19**

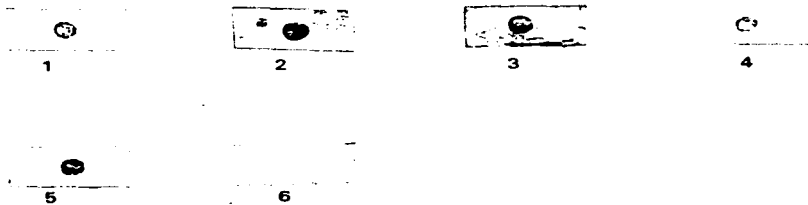
**Reconocimiento del Ag somático de *A. suum* por sueros de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*, mediante la técnica de IET**



- 1 Marcadores de peso molecular
- 2 al 5 Muestras de sueros de cerdos infectados con *A. suum*
- 6 Testigo (+)
- 7 Testigo (-)

**Fig. 20**

**Identificación de Abs anti-*A. suum* por suero de cerdos infectados naturalmente con *A. suum*, mediante la técnica de Dot-ELISA**



1 al 4 Muestras de suero de cerdos con *A. suum*  
5 Testigo (+)  
6 Testigo (-)

Las ventajas que presenta el Dot-ELISA son excelentes, una de ellas es que permite ver una reacción de color caré sobre un fondo blanco; lo cual a veces no es aparente por el ELISA convencional. También es posible usarla con una gamma de antígenos diferentes, y a su vez puede detectar y caracterizar anticuerpos de interés simultáneamente ( Hawkes, 1986).

Para poder tener una visualización más completa del estado general del cerdo, las muestras de sueros de cerdos infectados experimentalmente se trabajaron como muestras individuales; teniendo así, un total de 30 muestras (tabla 5). Así, de esta manera cuando se lleve a cabo la implementación de la técnica en el campo y los rastros nos va a permitir tener un criterio más amplio para diagnosticar una prueba como positiva o negativa.

Hay que enfatizar que las 13 muestras de sueros de los cerdos que dieron una reacción negativa mediante las pruebas de IET y Dot-ELISA fue por el hecho de que el nivel de anticuerpos anti-*T. spiralis* era muy bajo, pues la detección del antígeno de excreción-secreción se lleva a cabo entre 27 a 35 días después de la infección; esto es, cuando la larva ya se ha instalado en músculo ( Despommier, 1993).

Para obtener la sensibilidad y especificidad de las técnicas utilizadas en este estudio, se realizó un procedimiento nosológico haciendo uso de una tabla de contingencia estadística (tabla 6).

Por otra parte, existen estudios que han evaluado la respuesta inmune del cerdo, indicando que cuando se trata de una infección primaria el nivel de inmunidad intestinal es muy bajo; lo cual corroboró los resultados negativos obtenidos en las primeras semanas de infección, pues aún utilizando una prueba tan sensible como la IET no se logran detectar anticuerpos anti-*T. spiralis*.

A pesar de la existencia de numerosos estudios que se han realizado para entender algunos aspectos de la respuesta inmune en cerdos, se requiere mayor información acerca de los mecanismos que regulan dicha respuesta durante una infección por el parásito (Yépez-Muliá, 1994).

Así de esta forma, y mediante las fórmulas estadísticas expuestas (TABLA 7), se obtuvo finalmente la evaluación de la potencia diagnóstica del Dot-ELISA en la triquinosis porcina; mostrándonos que es un método económico, confiable, sensible y específico permitiéndonos descartar tanto reacciones falso negativos como falso positivos.

Las pruebas de control que se realizaron tanto en la técnica de IET como en Dot-ELISA tienen como objetivo el eliminar reacciones inespecíficas que pudieran presentarse por alguno de los materiales o reactivos utilizados para su realización (Figs. 14 y 22). Así de esta manera, se confirmó que los resultados que se obtuvieron realmente se presentaron debido a la presencia de anticuerpos anti-*T. spiralis*.

**TABLA 5**

**DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-*T. spiralis* EN CERDOS INFECTADOS  
MEDIANTE LAS TECNICAS DE IET Y DOT-ELISA**

SEMANAS POST-INFECCION		CERDO 1	CERDO 2	CERDO 3
		DOT-ELISA / IET	DOT-ELISA / IET	DOT-ELISA / IET
	1	NEG / NEG	NEG / NEG	NEG / NEG
	2	NEG / NEG	NEG / NEG	NEG / NEG
	3	NEG / NEG	NEG / NEG	NEG / NEG
	4	POS / POS	NEG / NEG	NEG / NEG
	5	POS / POS	POS / POS	POS / POS
	6	POS / POS	POS / POS	POS / POS
	7	POS / POS	POS / POS	POS / POS
	8	POS / POS	POS / POS	POS / POS
	9	POS / POS	POS / POS	POS / POS
	10	POS / POS	POS / POS	POS / POS

NEG = NEGATIVOS

POS = POSITIVOS

**TABLA 6****CONTINGENCIA ESTADISTICA  
TEOREMA DE BAYES**

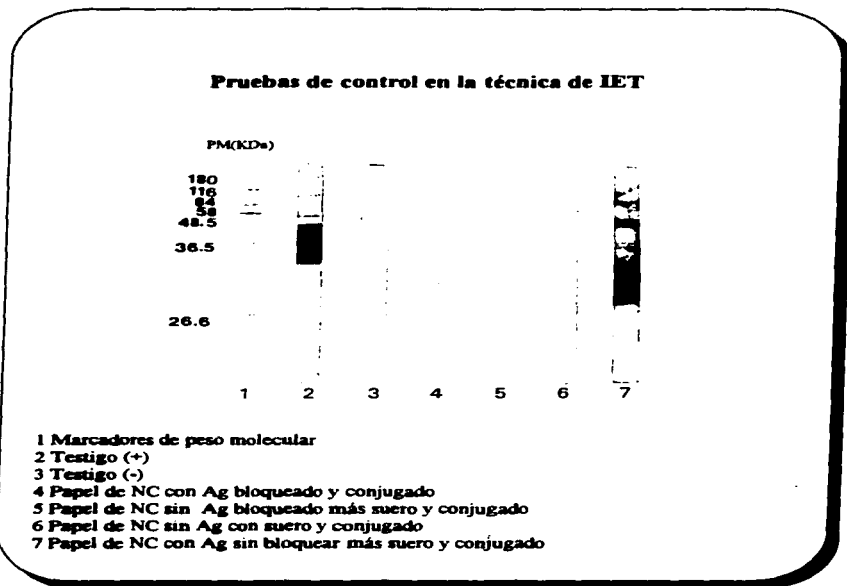
<b>DOT-ELISA</b>	<b>INMUNOELECTROTRANSFERENCIA</b>			
		<b>PARASITADOS</b>	<b>SANOS</b>	<b>TOTAL</b>
	<b>POSITIVOS</b>	17	0	17
	<b>NEGATIVOS</b>	0	13	13
	<b>TOTAL</b>	17	13	30

**TABLA 7****DETERMINACION DE PARAMETROS ESTADISTICOS**

<b>SENSIBILIDAD</b>	$17 / 17 = ( 1 \times 100 )$	<b>100%</b>
<b>ESPECIFICIDAD</b>	$13 / 13 = ( 1 \times 100 )$	<b>100%</b>
<b>POTENCIA DIAGNOSTICA</b>	$( 17 + 13 ) / 30 = ( 1 \times 100 )$	<b>100%</b>
<b>VALOR PREDICTIVO POSITIVO</b>	$17 / 17 = ( 1 \times 100 )$	<b>100%</b>
<b>VALOR PREDICTIVO NEGATIVO</b>	$13 / 13 = ( 1 \times 100 )$	<b>100%</b>
<b>INDICE DE FALSOS POSITIVOS</b>	0 / 17	<b>0%</b>
<b>INDICE DE FALSOS NEGATIVOS</b>	0 / 13	<b>0%</b>

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**Fig. 21**



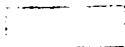


**Fig. 22**

**Pruebas de control en la técnica de Dot-ELISA**



1



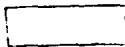
2



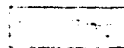
3



4



5



6

1 Testigo (+)

2 Testigo (-)

3 Papel de NC con Ag. bloqueado y conjugado

4 Papel de NC sin Ag. bloqueado, más suero y conjugado

5 Papel de NC sin Ag. con suero y conjugado

6 Papel de NC con Ag. sin bloquear más suero y conjugado

## CONCLUSIONES

⊙ La estandarización de la técnica de Dot-ELISA resultó de gran utilidad para diagnosticar la triquinosis porcina, pues la sensibilidad y especificidad resultó del 100% al compararse con la prueba de Inmunolectrotransferencia (IET).

⊙ Se caracterizó antigénicamente el antígeno de excreciones-secreciones de *T. spiralis*, determinando siete componentes de pesos moleculares de 33-38.5 a 229 KDa, que fueron reconocidos por los sueros de los cerdos experimentalmente infectados mediante la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET).

⊙ Los resultados obtenidos con sueros de cerdos infectados tanto experimental como naturalmente, muestran que la técnica de Inmunolectrotransferencia o Western blot es una prueba confirmatoria excelente en el caso de la triquinosis porcina.

⊙ El antígeno de excreciones-secreciones de larvas musculares de *T. spiralis* resulta muy adecuado para utilizarse tanto en la técnica de IET como en el Dot-ELISA, ya que reduce grandemente las posibles reacciones inespecíficas que generalmente se presentan en las pruebas inmunoenzimáticas.

⊙ La técnica de Dot-ELISA se considera una prueba de diagnóstico ideal para la triquinosis en cerdos, ya que es simple, económica, fácil de ejecutar y mantiene la sensibilidad y especificidad obtenida mediante la Inmunolectrotransferencia (IET).

# ANEXO

## **PREPARACION DE REACTIVOS**

### **1) Reactivos para la determinación de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col., 1951)**

Solución A: Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1N

Solución B: Sulfato de cobre pentahidratado al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2%

Se prepara el sulfato de cobre y el tartrato de sodio y potasio por separado y cuando se va a usar se mezclan por partes iguales; obteniendo así la solución B.

Solución C: Se prepara con 50 ml de la solución A y 1 ml de la solución B

Solución D: Diluir 2 ml del reactivo de fenol en 2 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Solución E: Albúmina sérica bovina (fracción V), a una concentración de 1mg/ml

### **2) Reactivos para la realización de Geles de poliacrilamida**

Solución A: Monómero de acrilamida

Acrilamida 30g

Bis-acrilamida 0.8g

Llevar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada, aforar hasta que la solución este a temperatura ambiente. Filtrar la solución después de aforar usando membrana de 0.42  $\mu$ m. Guardar a 4°C, no más de un mes.

Solución B: Regulador del gel separador 10X. Tris-HCl 1.5M, pH 8.8

Trizma base 18.15g

H<sub>2</sub>O destilada 90ml

Se ajusta el pH con HCl 6N. Se afora a 100ml. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

Solución C: Regulador del gel concentrador 5X. Tris-HCl 0.5M, pH 6.8

Trizma base 3.0g

H<sub>2</sub>O destilada 40ml

Se ajusta el pH con HCl 6N. Se afora a 50ml. Se filtra con papel Whatman #1 y se guarda a 4°C.

**Solución D: SDS al 10% (Dodecil-sulfato de sodio)**

SDS	10g
H <sub>2</sub> O desionizada	100ml

Filtrar con papel filtro, después de aforar. Guardar a temperatura ambiente.

**Solución E: Persulfato de amonio (PSA)**

Persulfato de amonio	20mg
H <sub>2</sub> O desionizada	200µl

**Solución F: TEMED**

TEMED	65µl
-------	------

**Solución G: Regulador de muestra 2X**

Solución C	1ml
Solución D	0.4ml
Glicerol 50%	0.4ml
2-β-mercaptoetanol	0.02ml
Azul de bromofenol 0.2%	0.1ml
Agua	0.08ml

Mezclar los componentes; colocar en volúmenes de 1ml en tubos eppendorf de 1.5ml y almacenarlos a -20°C.

**Solución H: Regulador de desarrollo (tris-HCL 0.025M, pH 8.3, glicina 0.192M, SDS**

0.1%)	
Tris	12g
Glicina	57.6g
SDS 10%	40ml
H <sub>2</sub> O desionizada	4L

**Solución I: Colorante Azul de Coomassie R-250 al 1% (stock)**

Azul de Coomassie	2.0g
H <sub>2</sub> O destilada	200ml

**Colorante (Azul de Coomassie R-250 0.125%, MeOH 50%, ácido acético 10%)**

Azul de Coomassie	62.5ml de la solución stock
MeOH	250ml
Acido acético	50ml
H <sub>2</sub> O destilada	500ml

**Solución decolorante I: (MeOH 50%, ácido acético 10%)**

MeOH	500ml
Acido acético	100ml
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Solución decolorante II: (MeOH 5%, ácido acético 7%)**

MeOH	700ml
Acido acético	500ml
H <sub>2</sub> O destilada	10L

**3) Reactivos para la electrotransferencia**

**Regulador de transferencia**

Trizma base	18.15g
Glicina	86.40g
MeOH absoluto	1200ml
H <sub>2</sub> O desionizada	5000ml

Ajustar a pH 8.3

**Tinción de proteínas (0.1% amido negro, MeOH 45%, ácido acético 10%)**

Amido negro	0.1g
MeOH absoluto	45ml
Acido acético	10ml
H <sub>2</sub> O destilada	100ml

**4) Reactivos para la inmunodetección**

**Amortiguador de fosfatos (PBS 10X, pH 7.4)**

Cloruro de sodio	80.0g
Fosfato monobásico de potasio	2.0g
Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado	29g
Cloruro de potasio	2.0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

**Regulador de bloqueo:**

Albúmina bovina 3%	3g
PBS 1X	100ml

**Regulador de lavado PBS-Tween 20 al 0.1%**

PBS 10X	100ml
Tween 20	1.0ml
H <sub>2</sub> O destilada	1000ml

#### Sustrato-cromógeno para peroxidasa

4-Cl- $\alpha$ -naftol	30mg
MeOH absoluto	10ml
PBS 1X	50ml
Peróxido de hidrógeno	50 $\mu$ l

#### 5) Solución digestora:

Pepsina ( 1:10,000)	3g/L
HCl concentrado	7ml/L

en solución salina al 0.85%

#### 6) Inhibidores de proteasas

EDTA 0.5M (400X)	
EDTA	1.86g
H <sub>2</sub> O desionizada	10ml

PMSF (100X) Fluoruro de fenil-metil-sulfonil	
PMSF	0.17g
Etanol absoluto	5 ml

TLCK (100X) N-Tosyl-lisil-clorometil-cetona	
TLCK	0.025g
HCl	5ml

TPCK (100X) L-1-Tosylamida-2-fenil-etilclorometil-cetona	
TPCK	0.05g
Isopropanol	10ml

#### 7) Medio de mantenimiento Rohrbacher (Rohrbacher, 1957)

Cloruro de sodio	2.40g
Cloruro de potasio	0.75g
Cloruro de calcio	0.55g
Cloruro de magnesio hexahidratado	0.20g



Fosfato de sodio dihidratado	2.70g
Carbonato de sodio	0.84g
Citrato de sodio	2.90g
Glucosa	3.60g

- (a) Disolver todos los componentes excepto el cloruro de calcio, de magnesio, carbonato de sodio y la glucosa, en 600 ml de agua bidestilada.
- (b) Disolver el cloruro de calcio y de magnesio en 200 ml de agua bidestilada.
- (c) Adicionar (a) en (b), agitar. Esterilizar por filtración.
- (d) Disolver el carbonato de sodio en 100 ml de agua bidestilada. Esterilizar por filtración.
- (e) Disolver la glucosa en 100 ml de agua bidestilada y esterilizar por autoclave ( 10 lb/10 min).
- (f) Mezclar (c), (d) y (e) y mantener en esterilidad.

### 8) Reactivos para la técnica de Dot-ELISA

#### Regulador de lavado PBS 1X

PBS 10X	100ml
H <sub>2</sub> O desionizada	1000ml

#### Solución de bloqueo

Leche svelty al 5%	5g
PBS 1X	100ml

#### Sustrato-cromógeno para peroxidasa

3-3-diaminobenzidina (DAB)	13mg
PBS 1X	25ml
Peróxido de hidrógeno	25µl

## BIBLIOGRAFIA

Añsa, B. J. L. Capítulo 12: Nemátodos. En: Lo fundamental en parasitología, Ediciones Doyma (1986), Barcelona (España): 66-69.

Alvarez, Ch. R., Carnero, R. E., García, R. J., Cob, S. C. y Wong, C. M. (1992) Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 49(5) : 286-290.

Ancha, P. N., Szyfres, B. Capítulo 124: Triquinosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales ,

Andrews, J. R. H., Ainsworth, R. and Abernethy, D. (1994) *Trichinella pseudospiralis* in humans: description of a case and treatment. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg. 88: 200-203.

Armas-Serra, C., Pardo, G. M., Bernadina, W. E., Cabeiro, R. F. (1995) Antibody response to a protease secreted by *Trichinella spiralis* muscle larvae. Parasitol. Res. 81: 540-542.

Arriaga, C., Paniagua, R., Rufz, N. A., Bautista, R. C., Morilla, A. (1984) Comparison of Dot-ELISA, Haemagglutination Test (PHT) and Thin Layer Immunoassay (TIA) in the diagnosis of natural or experimental *Fasciola hepática* infections in sheep. Veterinary Parasitology. 30-39: 197-203.

Arriaga, C., Morilla, A., Ortega-Pierres, G. (1992) Nuevos métodos para el diagnóstico de la triquinosis porcina. En: Avances en producción porcina. Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos. 1: 319-322.

Arriaga, C., Yopez-Mulfa, L., Morrilla, A. y Ortega-Pierres, G. (1995) Detection of circulation *Trichinella spiralis* muscle larva antigens in serum samples of experimentally and natural infected swine. Veterinary Parasitology. 58: 319-326.

Banch, J. F. Capítulo IV: Parásitos. En: Inmunología, Ediciones Ciencia y Técnica (1989), México: 441-450.

Barragán, J. (1893) Breves consideraciones sobre la triquina en México. Tesis de la Facultad Nacional de Medicina, México, D.F.

Biagi, F. Capítulo 44: Reacciones inmunológicas. En : Enfermedades parasitarias 2a. edición, La Prensa Médica Mexicana (1994), México: 351-355.

Brown, W. H., Franklin, A. N. Capítulo 6: Nemátodos intestinales del ser humano. En: Parasitología clínica 5a. edición, Interamericana (1985), México: 113-120.

Campbell, W. C. (1979) History of Trichinosis: Paget, Owen and the discovery of *Trichinella spiralis*. Bull. Hist. Med. 53: 520-552.

Chan, S. W. and Ko, C. R. (1988) Comparison between standar ELISA and Dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis. Trans. of the Roy. Soc. of Trop. Med. and Hyg. 82: 892-894.

Chester, B.P. y Clifton J.R. Capítulo 18: Nemátodos afasmídeos. En: Parasitología clínica 2a. edición, Salvat editores (1986), Barcelona (España): 251-260.

Chirasak, K. (1971) Output of larvae and life span of *Trichinella spiralis* in relation to worm burden super infection in the mouse. J. Parasitol. 57(2): 289-297.

Contreras Acosta, A. J. y Herrera Esparza, R. (1992) Triquinosis en el Estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología. 3(1): 25-27.

Dennis, D. T., Despommier, D. D. and Davis, N. (1970) Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. J. of Parasitol. 56(5): 974-977.

Denkers, Y. E., Wasson, D. L., Krco, C. J. and Hayes, E. C. (1990) The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single immunodominant epitope shared by multiple antigens. The J. of Immunology. 144: 3152-3159.

Despommier, D. D., Dennis, D. T. and Davis, N. (1970) Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. J. of Parasitol. 56(5): 974-977.

Despommier, D. D., Sukhdeo, M. and Meerovitch, E. (1978) *Trichinella spiralis*, site selection by the larva during the enteral phase of infection in mice. Exp. Parasitol. 44: 209-215.

Despommier, D. D. (1986) Trichinellosis. Immunodiagnosis of parasitic diseases. Academic Press, Inc. 1: 163-181.

Despommier, D. D., Karapelou, J. W. (1987) *Trichinella spiralis*. Springer-Verlag, N. Y. 100-103.

Despommier, D. D., Gold, A. M., Buck, W. S., Capo, V. and Silberstein, D. (1990) *Trichinella spiralis*: Secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. Exp. Parasitol. 71: 27-38.

Despommier, D. D., Gold, A. M. and Buck, W. S. (1990) Partial characterization of two antigens secreted by L1 larva of *Trichinella spiralis*. Molecular and Biochemical Parasitology. 41: 187-196.

Despommier, D. D. (1993) *Trichinella spiralis* and the concept of niche. J. of Parasitol. 79(4): 472-482.

Domínguez, A. J. L. (1992) Búsqueda de *Trichinella spiralis* en ratas de 3 centros de engorda porcina ejidal de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Rev. Mex. Parasitol.

Fragoso, R. U., Fuentes, V. H., García, T. P., Rodríguez, C. J. (1985) Informe de un brote de triquinosis en Laguna del Carretero, Zacatecas. Infectología. 6(5): 169-173.

Gamble, H. R., Anderson, W. R., Graham, C. E., Murrell, K. D. (1983) Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. Veterinary Parasitology. 13: 349-361.

Gamble, H. R. (1993) Larval (L1) antigens for the serodiagnosis of trichinellosis in swine and other species. In: Trichinellosis: Abstract of the Eight International Conference on Trichinellosis; Orvieto, Italy. 57.

Goldsmith, R. M. D., Heyneman, D. Capítulo 20.5: Triquinosis. En: Parasitología y medicina tropical; El Manual Moderno (1995), México: 546-553.

González, P. O., Arancibia, M. E., Rojas, A., González, J. O., Mac-Adoo, C., López, R., Contreras, M. y Schenone, H. (1988) Infección experimental en ratas AxC con dosis crecientes de inóculo de larvas de *Trichinella spiralis* y distribución de las larvas resultantes en diferentes grupos musculares. Bol. Chile. Parasitol. 43: 74-75.

Harrison En: Principios de medicina interna. 12a. edición, Mc. Graw-Hill (1991), Madrid, (España): 944-946.

Hawkes, R. (1986) The Dot-Immunobinding Assay. Methods in Enzymology. 121: 484-491.

Hernández, M., Ramos, M. E., Casco, S. E. J. y Perez, M. E. (1992) Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chih. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. Gac. Med. Mex. 128: 45-50.

Knapen, F. Van, Franchimont, J. H., Ruitenbergh, E. J., Baldelli, J. et al. (1980) 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.

Kosek, J. W. (1971) The molting pattern in *Trichinella spiralis*. I. A light microscope study. J. Parasitol. 57: 1015-1028.

- Kosek, J. W. (1971) The molting pattern in *Trichinella spiralis*. II. An electron microscope study. *J. Parasitol.* 57: 1029-1038.
- Leiby, D. A., Duffy, Ch. H., Darwin, M. K. and Schad, G. A. (1990) *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: Transmission in the rat population. *J. Parasitol.* 76(3): 360-364.
- Lichtenfels, J. R., Murrell, K. D., Pilitt, P. A. (1983) Comparison of three subspecies of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. *J. Parasitol.* 69(6): 1131-1140.
- Martínez-Marañón, R. (1979) Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan, Mex. *Sal. Publ. Mex.* 21: 161-165.
- Martínez-Marañón, R. (1985) ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? *Sal. Publ. Mex.* 27: 40-51.
- Martínez, P. O., Viguera, R. A., Carvajal, G. A., Flores, P. A. y Abraham, J. A. (1986) Triquinosis. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 43: 181-183.
- Martínez, P. O., Viguera, R. A., Gutierrez, C. M (1986) Triquinosis. *Bol. Med. Hops. Infant. Mex.* 3: 181-183.
- Mazzotti, L. (1953) Triquinosis en México. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 418-420.
- Méndez, R. (1990) El protocolo de investigación. Lineamiento para su evaluación y análisis. Ed. Trillas, 2a ed. México, D.F.
- Murrell, K. D., Anderson, W. R., Schan, G. A. et al. (1986) Field evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis. Efficacy of the excretory-secretory antigen. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1046-1049.
- Pappas, G. M., Hajkowski, R., Cannon, L. T. and Hockmeyer, W. T. (1984) Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): Comparison with Standard ELISA and Complement Fixation Assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 14: 239-249.
- Philipp, M., Taylor, M. P., Parkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. (1981) Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J. Exp. Med.* 154: 210-215.
- Pozio, E., Giuseppe, L. R., Murrell, K. D. and Lichtenfels, J. R. (1992) Taxonomic revision of the genus *trichinella*. *J. of Parasitol.* 78(4): 654-659.

Quiroz, R. H., Landeros, R. R. (1988) Valoración del tiempo de sobrevivencia de larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. Rev. Mex. de Parasitol. 1(1): 22-24.

Rabello, A. T. L., García, M. M. A., Neto, D.E., Rocha, R. S. and Katz, N. (1993) Dot-dye-immunoassay and Dot-ELISA for the serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis mansoni using keyhole limpet haemocyanin as antigen. Trans. of the Roy. Soc. of Tropic. Med. and Hyg. 87: 279-281.

Ramírez-Valenzuela, M. (1985) La triquinosis en México. Un estudio epidemiológico retrospectivo. En: Avances en enfermedades del cerdo. Editado por A. Morilla, P. Correa y A. Stephano. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A. C. México, D.F. 557-573.

Robbins, L. S., Angel, M., Kumar, V. En: Patología humana 3a. edición, Nueva Editorial Interamericana (1985), México: 646-647.

Robbins, L. S. En: Patología estructural y funcional 4a. edición, Mc. Graw-Hill. (1990) Madrid, (España): 442-444.

Rogan, M. T., Craig, P. S., Zeyhle, E., Roming T., Lubano, G. M. and Deshan, L. (1991) Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Trans. of the Roy. Soc. of Tropic. Med. and Hyg. 85: 773-777.

Ruitenbergh, E. J., Steerenberg, P. A., Brossi, B. J. M., Buys, J. (1974) Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. Bulletin W.H.O. 51: 108-109.

S.S.A. Dirección General de Investigación en Salud Pública (1975) Investigación de una probable epidemia de triquinosis. Bol. Informativo.23(4): 193-199.

Schenone, H. (1984) El problema de la triquinosis humana y animal en América Latina. Bol. Chile. Parasitol. 39: 47-53.

Seawright, G. L., Despommier, D. D., Zimmerman, W. Isentein, R. S. (1983) Enzyme immunoassay for swine trichinellosis using antigens purified by immunoaffinity chromatography. Am. J. of Trop. Med. and Hyg. 32: 1275-1284.

Silberstein S. D. and Despommier, D. D. (1984) Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. The. J. of Immunology. 132(2): 898-904.

Sinski, E., Jeska, L. E. and Bezubik, B. (1983) Enteral and parenteral response in mice after primary infection with *Trichinella spiralis* (nematoda). J. of Parasitol. 69(4): 645-653.

- Smith, H. J. (1988) Comparison of pepsin-digestion and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of trichinosis in swine. *Can. J. Vet. Res.* 52: 63-66.
- Soulé C., J. Dupovy-Camet avec la collaboration de T. Ancelle, P. Borréé et. L. Touratier (1993) La trichinellose: Une zoonose en évolution. Office International des Epizooties, Centre National d'Etudes, Vétérinaires et Alimentaires.
- Stewart, G. L. and Charniga, L. M. (1980) Distribution of *Trichinella spiralis* in muscles of the mouse. *J. Parasitol.* 66(4): 688-689.
- Su, X., Prestwood, A. K. (1991) A dot-ELISA mimicry Western blot test for the detection of swine trichinellosis. *Journal of Parasitology.* 77: 76-82.
- Todorova, V. K., Knox, D. P. and Kennedy, M. W. (1995) Proteinases in the excretory/secretory products (ES) of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 111: 201-208.
- Villacaña, H., Escobar, M. Castorena, G. D., Dfáz, A. (1984) Nuevos brotes de triquinosis en el Estado de Zacatecas. 26(3): 260-262.
- Walls, K. W., Shantz, P. M. (1986) Immunodiagnosis of parasitic diseases. Academic Press. Inc. U.S.A. 163-181.
- Weiger, L. H., Denksen, C. G. and Knapen, F. (1992) Identification of diagnostic antigens from *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Research.* 78: 112-119.
- Yépez-Mulfa, L. y Ortega-Pierres, G. (1994) Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 36(2): 127-138.
- Yépez-Mulfa, L. y Ortega-Pierres, G. (1994) Actualidades sobre la respuesta inmune hacia *Trichinella spiralis*. *Ciencia y Desarrollo.* 117: 44-50.
- Zamora, C. A., De la O-Cavazos, M. E., Bernar, R. R. M., Berrones, E. D. y Vázquez, A. C. (1992) Triquinosis aguda en niños. Brote epidémico intrafamiliar en la Ciudad de México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 47(6): 395-400.