

03062
11
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y
HUMANIDADES**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“ LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LA
TRIQUINELOSIS:
IMPORTANCIA EN LA RELACION HOSPEDERO
PARASITO Y EN EL DISEÑO DE METODOS DE
DIAGNOSTICO ”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
BIOL. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA**

DIRECTOR: M en IBB. DOLORES CORREA

MEXICO, D. F.

ABRIL DE 1987

**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.

DEDICATORIA

A MIS PAPAS, AMALIA Y JOSE LUIS:
porque en todo momento me han
brindado su amor y confianza.
¡Gracias por darme la oportunidad
de seguir superandome!

A MI HERMANA ELOINA:
porque al compartir el amor de
nuestros papás me ha enseñado
que todos los problemas tienen
más de una solución.

A RAQUEL:
porque de repente llegó a mi
mundo y, sencillamente, se
convirtió en él...

AGRADECIMIENTOS

A JORGE, LILIA Y ENRIQUETA, porque he contado con su apoyo incondicional, han estado conmigo en los malos momentos y han disfrutado conmigo los buenos. **GRIS Y NIEVES,** fue un placer trabajar con ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, con quienes siempre he intercambiado una sonrisa: Toño, Ame, Zoi, Arma, Isa, Bertha, Yola, Rick, Tere, Chelo, Lidia, Ale, Roberto, Rosy, Edith, Moni, Adriana, Doña Hilda, Olga, Gil.

MUY ESPECIALMENTE A LOLA, porque siempre ha apoyado mi desarrollo profesional y me ha brindado su mano amiga. ¡Gracias!

AI PUIS, UNAM, porque financió mis estudios de maestría entre noviembre de 1992 y mayo de 1993.

AI INDRE, porque le debo mi desarrollo profesional.

Este trabajo fue realizado con la dirección de la M. en I. B. B. Dolores Correa, en el Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, de la Secretaría de Salud.

El sustentante fue becario del CONACYT con número de registro 84235.

INDICE

Resumen	i
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Biología	2
1.2.1 Clasificación taxonómica del género <i>Trichinella</i>	3
1.2.2 Morfología de <i>Trichinella spiralis</i>	4
1.2.3 Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	6
1.3. Inmunobiología	8
1.4. La enfermedad	9
1.4.1 Signos y síntomas	9
1.4.2 Diagnóstico de la triquinelosis	10
1.4.3 Tratamiento de la triquinelosis	12
1.5. Epidemiología	13
2. Justificación	17
3. Objetivos	18
4. Materiales y Métodos	19
4.1 Sueros para el estudio de reacciones cruzadas	19
4.2 Población del estudio epidemiológico	20
4.3 Mantenimiento de la cepa de <i>Trichinella spiralis</i>	21
4.4 Infecciones experimentales y triquinoscopia	21
4.5 Digestión artificial	22
4.6 Preparación del extracto soluble antigénico	22
4.7 Preparación de los productos de excreción y secreción	23
4.8 Técnicas inmunoenzimáticas	24
4.8.1 ELISA	24
4.8.2 ELISA para la captura de antígenos circulantes	25
4.8.3 IET	27
4.9 Análisis estadístico	29
5. Resultados	30
5.1 Producción de antígenos	30
5.2 Estudio sobre reacciones cruzadas	31
5.2.1 Reactividad de los sueros por ELISA	31
5.2.2 Reactividad de los sueros por IET	32
5.3 Estudio epidemiológico en Cerritos, SLP	35
5.3.1 Detección de anticuerpos por ELISA empleando ESA	35
5.3.2 Reactividad de los sueros positivos hacia el ESA por IET	36
5.3.3 Reactividad de los sueros positivos hacia los PES por ELISA	40
5.3.4 Reactividad de los sueros positivos hacia los PES por IET	40
5.3.5 Análisis de los factores de riesgo	44
5.4 Determinación de anticuerpos y antígenos en el modelo experimental	45
5.4.1 Detección de anticuerpos por ELISA	45
5.4.2 Detección de anticuerpos por IET	52
5.4.3 ELISA para la detección de antígenos	56
5.4.4 Detección de la carga parasitaria	59
6. Discusión	65
7. Conclusiones	75
8. Referencias	76
Glosario	ii
Índice de cuadros y figuras	iii

RESUMEN

La triquinelosis es una zoonosis cosmopolita causada por la larva infectiva del nemátodo *Trichinella spiralis*. El ciclo de vida del helminto se lleva a cabo en el mismo hospedero e involucra dos fases: una entérica y otra parenteral. En el caso de triquinelosis humana, la diversidad de signos y síntomas que se presentan durante ambas fases pueden confundir el diagnóstico clínico.

Para ayudar a realizar el diagnóstico de la triquinelosis, se han utilizado varias técnicas para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis*; para ello, se han empleado desde los métodos más usuales hasta los más sensibles y específicos, como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET). Sin embargo y apesar de la existencia de estas técnicas, aún no se han realizado estudios que estimen la prevalencia de anticuerpos anti-*T. spiralis* a nivel nacional. Hasta la fecha, sólo se dispone de la información obtenida de la inspección del músculo esquelético de cadáveres humanos o de animales sinantrópicos en los que se busca a la larva infectiva.

Con el fin de valorar la presencia de reacciones cruzadas entre el sueros de pacientes con diferentes enfermedades y un extracto de la larva infectiva *T. spiralis* (ESA), se probaron por ELISA e IET, muestras de suero de pacientes con brucelosis, cisticercosis, entamoebosis, fiebre tifoidea, toxoplasmosis, oncocercosis, tricocefalosis y ascariosis. Por ELISA, no se detectaron anticuerpos de reacción cruzada, solo una muestra de un paciente con oncocercosis fue positivo al ensayo. Por IET, los sueros de los pacientes con oncocercosis y con ascariosis reaccionaron con componentes comprendidos entre 38 y 100 kDa, los cuales no correspondieron a los antígenos que reconocen los sueros de pacientes con triquinelosis. La muestra que fue positiva en ELISA, reaccionó con un antígeno de 77 kDa, que si es reconocido por los sueros de los pacientes con triquinelosis.

Considerando la ausencia virtual de reacciones cruzadas en el inmunodiagnóstico de triquinelosis, se efectuó un estudio epidemiológico de corte transversal en una población semirural en San Luis Potosí, empleando como prueba preliminar el ELISA sensibilizado con el ESA, y con el cual se observó una positividad del 1.9% (n=18). Las muestras positivas y 90 sueros negativos seleccionados de manera aleatoria, se sometieron a IET utilizando el ESA como antígeno; los sueros positivos reaccionaron con el antígeno y adicionalmente se observó que una muestra del grupo negativo reconoció una banda de 59 kDa. Utilizando los productos de excreción y secreción (PES) de la larva infectiva en el ELISA, se confirmaron 10 de los 18 sueros positivos y no hubo ninguna muestra positiva del grupo de los 90 sueros negativos. Usando los PES como antígeno en la IET, 15 de los 18 sueros positivos reaccionaron con el antígeno; el suero negativo que reaccionó con el ESA por IET, también reaccionó con los PES. Los factores de riesgo que se asociaron con la presencia de anticuerpos fueron pertenecer al género *femenino* y comer *moranga*.

Adicionalmente, en este trabajo, se determinó la cinética de aparición de anticuerpos en ratas infectadas experimentalmente, en la cual se observó que la respuesta anti-ESA se detecta desde los 14 días *post* infección (dpi), mientras que contra los PES, se detecta hasta los 25 dpi. En el análisis de respuesta humoral anti-ESA se observó que ésta se puede dividir, de manera general, en "antígenos de reconocimiento temprano" y "antígenos de reconocimiento tardío". Los primeros son reconocidos desde los 10 dpi y están constituidos por componentes de 45, 54, 63, 66, 94 y 104 kDa y los segundos son reconocidos a partir de los 25 dpi y están constituidos por componentes de 59, 73 y 77 kDa. En los PES, los sueros reconocen principalmente un duplete de 54 y 59 kDa, desde los 25 dpi.

Para tratar de detectar antígenos circulantes por ELISA, se utilizaron anticuerpos policlonales anti-ESA o anti-PES como medio de captura; sin embargo no se detectó antigenemia. Bajo la hipótesis de que la existencia de complejos inmunes en la muestra dificultaba la captura de antígenos, se hicieron pruebas para formar complejos inmunes *in vitro* para, después desnaturalizarlos y así detectar los antígenos libres; no obstante, con esta metodología tampoco fue posible detectar antigenemia.

1. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

La triquinelosis es una zoonosis de origen alimentario causada por la larva infectiva del nemátodo *Trichinella*, la cual se establece en el músculo esquelético de un gran número de especies de mamíferos, incluyendo el del hombre (Despommier, 1983; Martínez-Marañón, 1985). La presencia de estas larvas se ha observado en animales sinantrópicos como perros, gatos y cerdos (Arriaga *et al.*, 1989; Dame *et al.*, 1989; Mazzotti y Nuñez, 1948), así como en ratas capturadas en mercados públicos de la Ciudad de México (Mazzotti y Alcántar, 1954) y en granjas porcícolas de los Estados Unidos (Leiby *et al.*, 1990). También se han encontrado en caballos procedentes del Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México (Yépez, 1994b). En animales silvestres los hallazgos de *Trichinella* sp. han sido frecuentes (Kapel, 1995).

En la actualidad, la incidencia de esta parasitosis en los países industrializados es baja, ya que cuentan con una estrecha vigilancia epidemiológica (CDC, 1991; McAuley *et al.*, 1991); sin embargo, en los países en vías de desarrollo, como México, aún no se han documentado datos precisos sobre su prevalencia y distribución, pero existen estudios sobre la aparición de casos clínicos y brotes (Hernández *et al.*, 1992; Kim, 1983; Kolata, 1985; Martínez-Marañón *et al.*, 1979; Sarti *et al.*, 1986). En México, la triquinelosis sólo se diagnostica clínica y oportunamente en el Estado de México, Chihuahua, Zacatecas y el Distrito Federal (Fragoso, 1981; Martínez-Marañón, 1979); pero, de manera general, la triquinelosis, es diagnosticada incorrectamente y confundida con otras enfermedades (Martínez-Marañón *et al.*, 1979; Martínez-Marañón, 1985; Fragoso, 1981; Cabral *et al.*, 1989).

En este trabajo se abordó el estudio de las reacciones cruzadas entre un antígeno de *Trichinella spiralis* y sueros de pacientes con diferentes enfermedades, mediante el uso de técnicas inmunoenzimáticas. Con base en la utilidad diagnóstica de estas técnicas, se planteó un estudio de corte transversal en una zona semirural de San Luis Potosí para establecer la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. spiralis*. Adicionalmente y, con la finalidad de proponer métodos de diagnóstico que permitan detectar con certeza la presencia del helminto, se determinó la cinética de aparición de anticuerpos anti-*T. spiralis* y se trató de determinar la antigenemia en ratas infectadas experimentalmente.

1.2 BIOLOGIA

La triquinosis es una parasitosis de distribución mundial, causada por la larva infectiva del nemátodo *Trichinella*. Se ha considerado que el género *Trichinella* cuenta con ocho tipos genéticos, T1 a T8, porque entre ellos se presentan diferencias isoenzimáticas; de infectividad en cerdos, ratas y pájaros; de fertilidad; de presencia/ausencia de célula nodriza; de resistencia al congelamiento; de viabilidad en cadáveres y de inducibilidad de choque anafiláctico. De los ocho grupos genéticos, cinco han sido clasificados como especies porque, además de las diferencias en las características anteriores, se ha observado que algunos genes tienen secuencias diferentes: *T. spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4) y *T. nelsoni* (T7). Sin embargo y a causa de que las relaciones filogenéticas de los tipos genéticos T5, T6 y T8 no han sido esclarecidas por faltas de evidencias, aún no se les ha asignado la categoría de especie. Recientemente, en estudios de Biología Molecular, no se han observado diferencias en las secuencias génicas de estos grupos, de hecho, las secuencias de los genes estudiados se parecen a los de *T. nativa*, lo cual, en términos filogenéticos, los ubicaría más cerca de esta especie que de cualquier otra del género *Trichinella* (Mikhail *et al.*, 1994; Pozio *et al.*, 1992; Snyder *et al.*, 1993).

Todas las especies de *Trichinella* son infectivas para el hombre y se distribuyen de manera particular en el mundo: *T. spiralis* y *T. pseudoespiralis* son cosmopolitas, *T. nativa* se encuentra en las zonas árticas y subárticas, *T. nelsoni* en Africa tropical y *T. britovi* en la zona templada del paleártico (Belosevic y Dick, 1979; Pozio *et al.*, 1989a).

1.2.1 Clasificación taxonómica del género *Trichinella*¹

REINO	<i>Animalia</i>
SUBREINO	<i>Metazoa</i>
RAMA	<i>Eumetazoa</i>
GRADO	<i>Bilateria</i>
DIVISION	<i>Protostomia</i>
SUBDIVISION	<i>Pseudocoelomata</i>
SUPERPHYLUM	<i>Aschelminthes</i>
PHYLUM	<i>Nematoda</i>
CLASE	<i>Afasmidia</i>
ORDEN	<i>Enoplida</i>
SUBORDEN	<i>Enoplina</i>
SUPERFAMILIA	<i>Trichuroidea</i>
FAMILIA	<i>Trichinellidae</i> Ward 1907

Trichinella spiralis Owen, 1835.
T. nelsoni Pozio *et al.*, 1992.
T. nativa Britov y Boev 1972.
T. pseudoespiralis Garkkavi, 1972.
T. britovi Pozio *et al.*, 1992.
Tipo genético T5.
Tipo genético T6.
Tipo genético T8.

¹ Adaptada de Lamothe y García, 1988; Olsen, 1974; Pozio *et al.*, 1992.

1.2.2 Morfología de *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es un helminto que tiene la parte posterior ligeramente más ancha que la parte anterior. El esófago consiste de una parte anterior pequeña y musculosa y una parte posterior más ancha y glandular llamada esticosoma, las células que constituyen el esticosoma, esticocitos, poseen gránulos secretores antigénicos que descargan en la luz del esófago. Los esticocitos se dividen en α y β dependiendo del tamaño de la secreción del gránulo (los esticocitos α secretan polipéptidos mayores a 50/55 kDa y los β secretan un polipéptido de 48 kDa), de la morfología y del gradiente de sedimentación del gránulo. El intestino del helminto es de tipo tubular y se abre en un ano casi terminal (Silberstein y Despommier, 1985).

Los machos miden entre 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40 μm de diámetro. Las hembras miden de tres a cuatro milímetros de longitud por 60 μm de diámetro, las hembras pueden diferenciarse de los machos por presentar el extremo posterior romo y redondeado, mientras que los machos presentan dos apéndices caudales lobulados y, como carácter distintivo del grupo, no presentan espículas copulatrices (Olsen, 1974; Lamothe y García, 1988). Las hembras presentan la vulva cerca de la mitad del esticosoma y poseen un solo ovario localizado en la parte posterior, el cual, produce óvulos de aproximadamente 25 μm de diámetro; cada óvulo presenta tres cromosomas. Los machos producen espermatozoides de dos o tres cromosomas y no son flagelados, por lo que es éste quien determina el sexo de la descendencia: las células somáticas de las hembras tienen seis cromosomas y las de los machos cinco. Las larvas recién nacidas (LRN), miden 120 μm de longitud por siete micra de diámetro y ellas representan la fase de invasión al músculo. La larva infectiva (L_1) se localiza en el músculo, mide aproximadamente 1.2 mm de longitud por 40 μm de diámetro y se encuentra rodeada de una cápsula de colágena (Despommier, 1983). En la figura 1 se muestra un esquema de la hembra y de la larva infectiva.

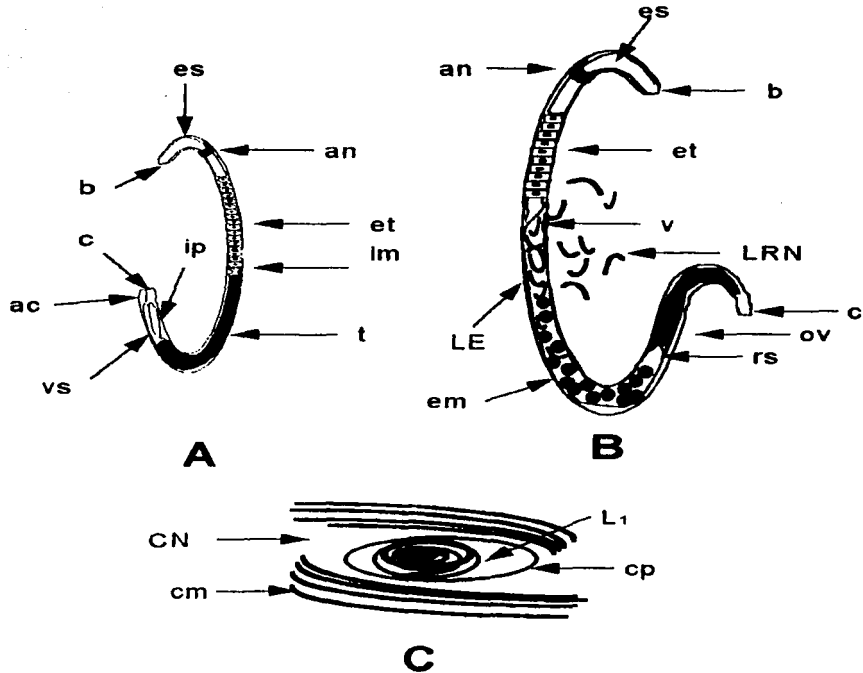


Figura 1. Esquema de la morfología de *Trichinella spiralis*. En A) se representa al macho, en B) a la hembra y a las larvas recién nacidas (LRN), en C) a la larva infectiva (L₁). Anillo nervioso (an), boca (b), cápsula (cp), célula muscular (cm), célula nodriza (CN), cloaca (c), embriones (em), esófago (es), esticosoma (et), intestino medio (im), intestino posterior (ip), larva infectiva (L₁), larvas en embriogénesis (LE), ovario (ov), receptáculo seminal (rs), testículo (t), vulva (v).

1.2.3 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es considerado un parásito intracelular en el que todos sus estados de desarrollo ocurren en un solo hospedero. El ciclo de vida se caracteriza por presentar dos fases: una entérica, que involucra cuatro estadios larvarios y el adulto; y una parenteral que incluye la migración de la larva recién nacida (LRN) y el establecimiento de la larva infectiva (L_1) en el músculo esquelético (Despommier, 1977; Stewart y Giannini, 1982).

Fase entérica.

El hombre, al igual que cualquier otro hospedero potencial, se infecta al ingerir carne cruda o insuficientemente cocida que alberga a la larva infectiva (L_1); en el estómago, estas larvas son liberadas del músculo esquelético por acción de los jugos gástricos y ocupan aproximadamente diez minutos en emigrar e invadir el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado. A pesar de que *T. spiralis* es capaz de ocupar cualquier parte del intestino delgado, generalmente se sitúa en el duodeno (Dick y Silver, 1980).

Treinta horas *post* infección (30 hpi), la larva infectiva sufre cuatro mudas (de L_2 a L_5) hasta convertirse en adulto; durante esta etapa de cambio, las larvas llevan a cabo una morfogénesis extensa: remodelan cutícula, células glandulares hipodérmicas, músculos, sistema nervioso, primordio genital, aparato digestivo y esticosoma.

El adulto ocupa una hilera de células epiteliales columnares del intestino. A los cinco días *post* infección (5 dpi), la hembra llega a invadir hasta 425 células y el macho 152 (Despommier, 1983). La cópula se efectúa en el nicho intramulticelular dentro de las siguientes 40 h (160 hpi). Los machos reptan hasta ocupar una hilera de células adyacentes a las que ocupan las hembras; *in vitro* se ha identificado que las hembras producen una feromona que atrae a los machos (Belosevic y Dick, 1980). Se tiene estimado que un macho puede inseminar a dos hembras ya que el promedio de adultos recuperados de infecciones experimentales es de dos hembras por macho (Olsen, 1974). Después de la inseminación, los machos mueren y son expelidos, mientras que las hembras aumentan de tamaño y penetran la mucosa intestinal, llegando, incluso al peritoneo y a los ganglios linfáticos mesentéricos.

Fase parenteral

Después de 90 horas de embriogénesis, las larvas recién nacidas (LRN) son paridas (11 dpi) y se introducen inmediatamente en la lámina propia y entran a la circulación arterial vía conducto torácico; pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir las células del músculo esquelético, donde se establecen definitivamente. En estas células, las larvas inician un periodo de desarrollo *post* embrionario creciendo exponencialmente, la diferenciación ocurre entre los cuatro y los 20 días después de la penetración (entre los 15 y 30 dpi). En esta etapa las larvas comienzan a enrollarse (de ahí el nombre de la especie: *T. spiralis*) y a diferenciarse sexualmente. La transformación de la célula muscular en célula nodriza dura aproximadamente 20 días. El helminto induce cambios profundos en los miocitos, en los que las estrias desaparecen y los filamentos contráctiles se desorganizan, se incrementa el número de mitocondrias y aumenta la actividad catalítica, así como aumenta el tamaño del núcleo y se reubica al centro de la célula, el glicocáliz se hipertrofia y se transforma en una capa gruesa de colágena.

Finalmente la célula nodriza es rodeada de vénulas que servirán como medio de transporte desde y hacia el interior de la célula. En el desarrollo y mantenimiento de la célula nodriza, se ha propuesto que la participación de una molécula de secreción de 43 kDa es fundamental, ya que se ha observado su presencia desde el día ocho *post* penetración y hasta después de seis meses *post* infección en el núcleo y en el citoplasma de la célula nodriza; aunque la función biológica de esta proteína no se conoce, se ha propuesto que interacciona directamente con el genoma de la célula, ya que el primer día que se detecta coincide con el aumento máximo del núcleo y del nucleolo (Despommier, 1990; Despommier *et al.*, 1991; Stewart y Giannini, 1982).

Se ha argumentado que la formación de la cápsula podría proteger a la larva de la respuesta inmune del hospedero (Bagheri *et al.*, 1986) y que además le podría conferir resistencia al congelamiento (Pozio *et al.*, 1989b). En algunos hospederos de vida no longeva, la célula nodriza mantiene viva a la larva infectiva durante toda la vida del animal; pero, en el ser humano se ha observado que la célula nodriza se calcifica y la larva L₁ muere (Martínez-Marañón *et al.*, 1974). El ciclo se inicia nuevamente cuando la larva infectiva es transmitida a otro hospedero de la misma u otra especie (figura 2).

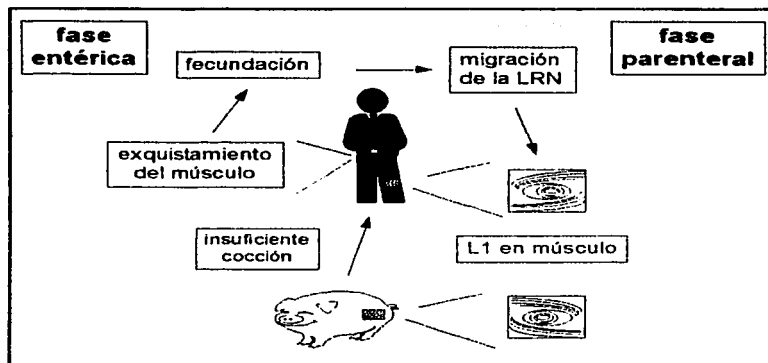


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

1.3 INMUNOBIOLOGÍA

La respuesta inmune hacia *Trichinella* ha sido ampliamente estudiada en diferentes condiciones y modelos experimentales (Almond *et al.*, 1986; Ortega-Pierres *et al.*, 1989; Parkhouse y Ortega-Pierres, 1984; Silberstein, 1983), de manera particular, el estudio de la respuesta celular se ha enfocado hacia la forma en que actúa sobre los estados entéricos. Se ha observado que los linfocitos TH₂, al producir interleucinas 3, 4 y 5 regulan la reacción de inflamación en el intestino delgado: por un lado favorecen la infiltración y el aumento del número de células cebadas y eosinófilos y por el otro, aumentan las concentraciones de histamina, leucotrienos y algunas enzimas, con lo cual, la mucosa del intestino delgado se daña y se estimulan las contracciones peristálticas, que culminan con la expulsión de los helmintos; fenómeno que causa la inhibición del desarrollo de los estados enterales y la disminución de la fecundidad de las hembras (Despommier *et al.*, 1977; Wakelin y Wilson, 1980). También se ha observado en estudios *in vitro* que las células de la lámina propia del intestino se adhieren fuertemente a la superficie del helminto, bloqueando de esta manera la sobrevivencia de la larva recién nacida (Lee y Befus, 1989).

En el estudio de la respuesta humoral de los pacientes con triquinelosis se han detectado anticuerpos de las clases IgE, IgA, IgM e IgG; la IgG es la clase principal de inmunoglobulina que se manifiesta durante el curso de la infección. En orden secuencial, primero aparecen la IgG1, luego la IgG3 y finalmente la IgG4. Esta última subclase se ha asociado con una respuesta crónica, aunque su presencia no correlaciona con la de IgE, la cual puede ser inespecífica (Ljungstrom *et al.*, 1988). Mediante el uso de la inmunolectrotransferencia (IET), se ha observado que los sueros de pacientes con triquinelosis reaccionan con ocho antígenos de un extracto total de la larva infectiva, aunque la frecuencia de reconocimiento de cada antígeno es independiente: las bandas de 38 y 104 kDa son reconocidas por el 40% de los sueros, las de 59 y 63 kDa por el 80% y las de 54, 73, 77 y 93 kDa por el 90% (Aicántara y Correa, 1993; Almond *et al.*, 1986; Arriaga *et al.*, 1989; Ortega-Pierres *et al.*, 1989). Los sueros de cerdos, ratas y ratones infectados, así como los de conejos hiperinmunes, reconocen el mismo conjunto de antígenos. Recientemente se ha identificado que el epitopo responsable de la inmunodominancia de estos antígenos es un carbohidrato denominado tivelosa que además se encuentra en la superficie, en el esticosoma y en los productos de excreción y secreción de la L1, (Reason *et al.*, 1994).

1.4 LA ENFERMEDAD

1.4.1 Signos y síntomas

El cuadro clínico de la triquinelosis se presenta del primero al quinto día *post* infección (dpi). Los principales signos y síntomas son dolor abdominal intenso, diarrea, cefalea, náuseas, vómito, astenia, fiebre, escalofrío y eosinofilia. También se ha observado que aumenta la creatinina fosfocinasa sérica y que el malestar general es notorio; algunos síntomas persisten durante los siguientes 15 días y después el cuadro clínico puede agravarse (entre los 20 y 30 dpi), presentándose entonces, edema facial de predominancia periorbital, dolor muscular, artralgias, contracciones musculares, pérdida de peso, adinamia, sopor, ronchas máculo-papulares, fiebre mayor a 40°C, meningoencefalitis, miocarditis, soplo cardíaco, coma e inclusive muerte en las infecciones graves (Biagi, 1985; Compton *et al.*, 1993; Fragoso, 1981; Martínez-Marañón *et al.*, 1979).

Con base en la complejidad del cuadro clínico, la triquinosis puede clasificarse en asintomática o subclínica, oligosintomática y polisintomática. La triquinosis polisintomática, puede a su vez, clasificarse en leve, moderada y grave de acuerdo a la intensidad de la infección. En el caso de la triquinosis humana, se consideran infecciones leves aquellas en las que existen de 1 a 50 larvas por gramo de músculo, moderadas de 50 a 100 y graves de 100 a más (Martínez-Pantaleón *et al.*, 1986).

De manera general, en el desarrollo de esta parasitosis se distinguen tres periodos: incubación, migración y encapsulación. La primera ocurre durante la fase enteral y consiste en la liberación de la larva infectiva del músculo esquelético, la muda de L₂ a L₅ y la penetración de las hembras en la mucosa intestinal. En este periodo se presenta falta de apetito, pérdida de peso, mala absorción y mala digestión, inflamación del intestino, náuseas, vómito, diarrea y dolor intestinal (Olsen, 1974). El segundo periodo incluye el nacimiento de las larvas LRN, su migración y la invasión del músculo esquelético. Este periodo se asocia con dolor muscular durante la respiración, la conversación, el movimiento ocular y en la masticación; en muchas ocasiones se observa edema de periorbital, inflamación de los ganglios linfáticos y fiebre intermitente (Martínez-Marañón, 1979). El tercer periodo comprende el encapsulamiento de la larva infectiva; normalmente se presenta deshidratación y dolor muscular. En las infecciones graves, la presión sanguínea puede abatirse y pueden presentarse encefalitis, parálisis e incluso coma (Biagi, 1985).

1.4.2 Diagnóstico de la triquinosis

El diagnóstico clínico de la triquinosis es difícil porque puede presentarse como una enfermedad individual o de un grupo, porque puede tener varios tipos de gravedad y porque puede estar acompañada de un gran número de signos y síntomas que la enmascaran: deshidratación, diarrea, dolor abdominal, fiebre, dolor muscular, soplos cardíacos, encefalitis y parálisis. Además, las pruebas de laboratorio como la biometría hemática (más de 500 eosinófilos/mm³), las enzimáticas (presencia de 1, 6-difosfofructoaldosa y deshidrogenasa láctica) y las serológicas (ensayos enzimáticos, hemaglutinación e inmunofluorescencia indirecta) son positivas hasta los 15 días después de haberse iniciado la infección (Cabral *et al.*, 1990; Pawlowski, 1983).

Los estudios que se han encaminado a detectar la triquinosis en la fase entérica son escasos ya que, por un lado, en esta fase, el síndrome se confunde con otros padecimientos como fiebre tifoidea, brucelosis e intoxicación alimentaria (Cabral *et al.*, 1989; Martínez-Marañón, 1985) y por otro, los ensayos que se han instrumentado para detectar a los adultos son de baja sensibilidad y especificidad (Chapa, 1991).

Algunos aspectos que apoyan el diagnóstico clínico, son los antecedentes epidemiológicos de la región y el consumo de carne o productos de cerdo (Cabral *et al.*, 1989). En los lugares donde el diagnóstico es exclusivamente clínico, la triquinosis puede ser confundida con intoxicación alimentaria, fiebre tifoidea, cisticercosis, faringitis, nefritis, reumatismo, glomerulonefritis, amigdalitis, escarlatina, pielonefritis y brucelosis (Cabral *et al.*, 1989; Fragoso, 1981; Martínez-Marañón, 1985; Martínez-Marañón *et al.*, 1979).

Para realizar el diagnóstico etiológico de la triquinosis se han empleado diferentes técnicas como: la triquinoscopia, la digestión del tejido muscular y el xenodiagnóstico; empero, no siempre es posible obtener una biopsia, debido a que el procedimiento es traumático y al riesgo de infecciones posteriores en o a través de la herida (Kolata, 1985; Zimmermann, 1983). Algunos estudios comparativos han documentado que la sensibilidad del diagnóstico etiológico es del 56% con respecto a la detección de anticuerpos (Au *et al.*, 1983).

El inmunodiagnóstico para la detección de anticuerpos ha sido de gran valor para apoyar el diagnóstico clínico y para realizar estudios epidemiológicos. Debido a la versatilidad de esta metodología, se han empleado varias técnicas como: las pruebas intradérmicas, la floculación de bentonita, la fijación del complemento (sensibilidad 23%), la hemaglutinación indirecta (sensibilidad 86%), la inmunofluorescencia indirecta (sensibilidad 95%), la contrainmunolectroforesis y los ensayos inmunoenzimáticos (sensibilidad 99%; revisado en Alcántara *et al.*, 1992). Sin embargo, como el uso de técnicas de baja especificidad pueden producir reacciones cruzadas entre extractos crudos y anticuerpos inespecíficos (Barriga, 1977; Weiner y Price, 1956), se ha planteado que el uso de exoantígenos (Gamble, 1984), de antígenos recombinantes (Yépez *et al.*, 1995) o del polisacárido tivelosa (Ortega-Picrres *et al.*, 1996) pueden disminuir las reacciones falsas positivas.

Actualmente, los estudios del diagnóstico de triquinosis se enfocan a tratar de detectar productos circulantes de la larva infectiva (Arriaga *et al.*, 1995; Ivanoska *et al.*, 1989; Nishiyama *et al.*, 1992), lo cual tiene una implicación importante, ya que la detección de antígenos puede emplearse para evaluar tratamientos o para evidenciar casos asintomáticos. A nivel epidemiológico, la detección de antígenos podría dar a conocer áreas geográficas con baja, mediana o alta prevalencia; sin embargo, los ensayos instrumentados no tiene la sensibilidad ni la especificidad adecuada para ser una prueba de rutina. Para tratar de explicar este hecho se ha supuesto, que los antígenos no se detectan porque se encuentran formando complejos inmunes o porque son moléculas necesarias para mantener al funcionalidad de la célula nodriza y no llegan a la circulación (Arriaga *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1994).

1.4.3 Tratamiento de la triquinosis

Para la erradicación de los helmintos en la fase intestinal, se ha empleado el pamoato de pirantel (10 mg/kg, durante cuatro días), el mebendazol (200 mg durante cuatro días o 250-400 mg tres veces al día durante tres semanas) y el albendazol (400 mg/día/tres días).

Para tratar la fase parenteral, se ha usado de manera exitosa el tiabendazol en dosis de 50 mg/kg/día y el tiabendazole en dosis de 25 mg/kg/dos veces al día/10 días. Otras drogas como el mebendazol y el fluconazole no han sido útiles para la erradicación del helminto, aunque el primero se ha utilizado a dosis de 200-400 mg/kg/cadaa 8 h/10 días (Biagi, 1985; Velasco, 1991). El tratamiento que se usa es igual para niños y adultos, pero esta contraindicado en mujeres embarazadas y pacientes que han experimentado reacción alérgica al fármaco de elección (Compton *et al.*, 1993; Pawlowski, 1983). En los vivarios se ha empleado el albendazol (1mg/kg/tres días) de manera rutinaria para la desparasitación de los animales de laboratorio (Owen, 1990).

Para prevenir el choque anafiláctico que pueda resultar del número de larvas muertas en el tejido muscular, se han usado corticoesteroides (debido a su acción antiinflamatoria, antialérgica y antichoque) durante la etapa inicial del tratamiento antihelmíntico (Andrews *et al.*, 1994). La dexametasona se ha empleado en dosis de 0.5 mg/kg/día durante cinco días sucesivos (Martínez-Pantaleón *et al.*, 1986) y la prednisona a razón de 40 mg/día/dos semanas (Compton *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha observado que la administración de corticoesteroides para tratar la miositis, incrementa con frecuencia la viabilidad de las hembras adultas con lo cual, la larviposición puede aumentar y con ello una infección masiva (Velasco, 1991).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

Desde 1876, año en que se identificó a la larva infectiva en una necropsia humana, se han descrito casos clínicos y verificaciones en autopsias de manera rutinaria en todo el mundo (revisado en Campbell, 1983; Mazzotti y Chavira, 1943); también se han realizado estudios antropológicos en momias americanas en las que se han identificado restos que sugieren la presencia de *Trichinella* sp. (Reinhard, 1991). Muchos de los estudios que se han realizado para buscar *Trichinella* spp. se han hecho en cadáveres de seres humanos y animales peridomésticos (Martínez-Marañón *et al.*, 1974; Mazzotti, 1944; Mazzotti y Alcántar, 1954; Mazzotti y Chavira, 1943; Mazzotti y Nuñez, 1948).

En México, el primer hallazgo de *Trichinella* que se encontró fue durante una autopsia practicada en la Escuela Nacional de Medicina en el año de 1891 (revisado en Mazzotti y Nuñez, 1948), desde entonces se han conocido algunos casos clínicos, brotes y verificaciones en autopsias, sin embargo no es hasta la década de los años 70 en que inició el estudio de la triquinelosis de manera sistemática (Martínez-Marañón, 1985). Las evidencias de que la parasitosis se distribuye a nivel nacional y que es más frecuente en las regiones rurales que en las ciudades, son amplias (Cabrera, 1977; Correa *et al.*, datos no publicados; Martínez-Marañón, 1979; Hernández *et al.*, 1992).

Algunos autores han propuesto que la triquinelosis es un problema de salud pública porque el número de casos registrados (más de 363 entre 1981 y 1990) podrían colocarla como una de las parasitosis más importantes del país (Martínez-Marañón, 1985; Yépez y Ortega-Pierres, 1995); sin embargo aún existen áreas dentro de la República Mexicana que no han informado de la presencia de esta parasitosis (figura 3). Según una revisión del Martínez-Marañón (1985), en la Ciudad de México, entre 1891 y 1973 se diagnosticaron por serología, biopsia o clínica 53 casos, en los cuales hubo una asociación entre el consumo de carne de cerdo/embutidos y la enfermedad. Según la revisión, los brotes que se presentaron en 1947, se asociaron con el consumo de salchichas crudas. Entre 1975 y 1982 ocurrieron numerosos brotes en el estado de Zacatecas, en los cuales se involucraron 108 casos con seis defunciones; los casos se asociaron con el consumo de chorizo crudo. En 1975, un brote en la Ciudad de México se asoció con el consumo de cecina preparada en Yauhtepec, Morelos (Martínez-Marañón, 1985).

A mediados de 1978, en Naucalpan, Estado de México, hubo un brote que afectó a cuatro de siete integrantes de una familia, quienes consumieron chorizo crudo procedente del estado de Durango; el diagnóstico etiológico se encontraron larvas infectivas en la biopsia y en el chorizo que no se consumió (Martínez-Marañón, 1979).

Entre 1974 y 1986 ocurrieron varios brotes en diferentes entidades de la República Mexicana y en el Distrito Federal. En este lapso se registraron 160 casos y nueve defunciones, la mayoría de los casos se confirmaron por biopsia y se asociaron con el consumo de carne de cerdo procesada en chorizo o "al pastor " (Martínez-Marañón, 1979; Fragoso, 1981),

Aunque existe una gran diferencia entre el número de casos diagnosticados por periodo de tiempo y región, el hecho es que la presencia de brotes de triquinelosis es común en México; de 1891 a 1973, 55 casos; de 1974 a 1983, más de 250 (Martínez-Marañón, 1985); de 1989 a 1994, más de 250 (Alcántara *et al.*, 1989; Correa *et al.*, datos no publicados; Salinas, 1994). Algunos estudios de prevalencia, llevados a cabo mediante el examen de muestras de músculos obtenidas en autopsias médico-legales efectuadas entre 1972 y 1973 en la Ciudad de México (Martínez-Marañón, 1974) y mediante la reacción de floculación con bentonita en Chiapas han indicado una prevalencia de 4.2 y de 2.4% respectivamente (Cabrera, 1977).

Las muestras de suero de personas que estuvieron involucradas en varios brotes entre 1988 y 1989 en diversos lugares del país, se remitieron al INDRE, SS. para realizar la búsqueda de anticuerpos α -*Trichinella*; 69 de los 163 casos fueron positivos en un inmunoensayo (Alcántara *et al.*, 1989).

En 1989, ocurrió un brote en Toluca, Estado de México, el cual se asoció con el consumo de chorizo. En este estudio se detectaron anticuerpos anti-larva infectiva en el 100% de los casos desde la tercera semana *post* infección. También se detectaron anticuerpos anti-adulto y anti-LRN en el 43% y en el 68% de los sueros respectivamente (Salinas, 1994).

Uno de los brotes más recientes ocurrió en Ciudad Delicias, Chihuahua, el cual, se asoció con el consumo de chorizo preparado con carne de un cerdo que fue certificada con el sello de sanidad. En este brote hubo una defunción de 167 personas afectadas, de ellas, el 86% cursaron con mialgias, el 73% con edema facial, el 75% con leucocitosis, el 60% con eosinofilia y todos con malestar general. El 86% de 21 pacientes cursaron con electromiografía anormal. El diagnóstico se realizó clínicamente y mediante biopsia en 59 pacientes (Hernández *et al.*, 1992).

En mayo de 1994 se presentó un brote en Chalco, Estado de México, para apoyar el diagnóstico clínico se remitieron al INDRE 48 sueros de individuos involucrados, 12 con sospecha clínica y 36 de convivientes. En los sueros de los individuos con sospecha clínica, se detectaron anticuerpos en siete por ELISA e IET y en tres sólo por IET; dos sueros fueron negativos por ambas técnicas. En los sueros de los convivientes, se detectaron anticuerpos en dos por ELISA e IET y en uno por IET, los 33 sueros restantes fueron negativos (Correa *et al.*, datos no publicados).

En México la triquinosis es una zoonosis que se ha considerado como una enfermedad de tipo epidémico, porque se presenta en forma de brote; sin embargo, aún no se han realizado estudios sistemáticos que consideren el contacto entre el ser humano y el helminto, por ello, estos antecedentes y otras consideraciones nos llevaron a plantear los objetivos de este trabajo.

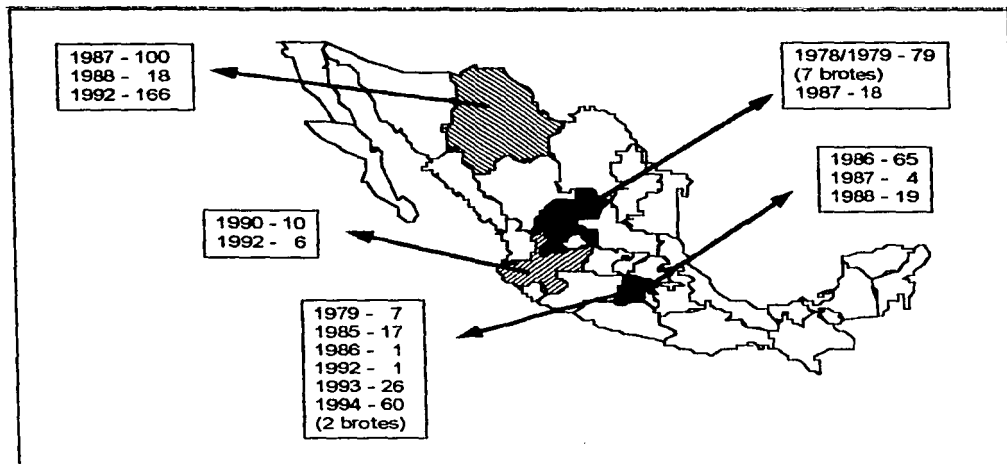


Figura 3. Brotes y casos de triquinelosis en la República Mexicana. En la figura se muestra el números de personas involucradas en brotes de triquinelosis oficialmente registrados en forma de artículos científicos o como reportes de epidemia en la Dirección General de Epidemiología, de la Secretaría de Salud (México), durante el periodo comprendido entre el año de 1978 al año de 1994. La figura es una modificación de la originalmente reportada por Correa y colaboradores (en prensa).

2. JUSTIFICACION

El estudio de la respuesta inmune humoral en la triquinelosis es de gran importancia porque permitiría plantear métodos de diagnóstico que puedan ser usados para detectar y confirmar casos clínicos. Además, estos métodos podrían ser empleadas en estudios epidemiológicos. De manera particular, para realizar el diagnóstico de la triquinelosis existen varios métodos inmunológicos de alta sensibilidad y especificidad, como el ELISA y la IET; sin embargo, con estos ensayos, aún no se han valorado las reacciones cruzadas que pudieran existir entre el suero de pacientes con diferentes enfermedades y el antígeno de la larva infectiva que se utiliza para el diagnóstico.

Considerando que en México el consumo de carne de cerdo y de animales silvestres es generalizado y que las condiciones de crianza y matanza son deficientes y clandestinas, es posible suponer que la transmisión de *Trichinella* sp. podría ser mucho más frecuente de lo que se tiene registrado, por lo que la realización de un estudio epidemiológico de corte transversal para detectar anticuerpos α -*Trichinella* en una zona rural y porcicultora del estado de SLP podría dar evidencia del contacto entre el ser humano y el helminto.

Sin embargo y a pesar de que se sabe que las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de triquinelosis son positivas después de los 15 dpi, aún no se conoce con precisión en que momento dentro del curso de la parasitosis se detectan por primera vez anticuerpos, ni cuales son los primeros antígenos que se reconocen en preparaciones antigénicas de la larva infectiva. Además, como la detección de anticuerpos no pone de manifiesto una parasitosis activa (en el caso de triquinelosis y otros parásitos), sino que solamente enfatiza el contacto que ha tenido el hospedero con el helminto, es importante contar con una técnica que permita demostrar la parasitosis para conocer cual es la presión parasitaria en la zona de estudio y con ello plantear medidas profilácticas.

3. OBJETIVOS

Buscar la presencia de anticuerpos de reacción cruzada en el suero de pacientes con diferentes enfermedades (brucelosis, cisticercosis, oncocercosis, fiebre tifoidea, toxoplasmosis, entamoebiosis, tricocefalosis, ascariosis) y en el suero de pacientes con pruebas febriles positivas (anticuerpos anti-antígenos de *Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A y B, *Brucella abortus* y rickettsias) en contra de un extracto soluble antigénico (ESA) de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* mediante el uso del ensayo inmunoenzimático (ELISA) y de la inmunoelectrotransferencia (IET).

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trichinella* dentro de una población porcicultora y rural, aparentemente sana de San Luis Potosí, en un estudio epidemiológico de corte transversal, usando como prueba tamiz el ELISA y como prueba confirmatoria la IET.

Detectar que factores biológicos, socioeconómicos o culturales de la población en el estudio epidemiológico se encuentran asociados con la presencia de anticuerpos.

Realizar una cinética de aparición de anticuerpos en un modelo de triquinelosis experimental, para determinar en que momento dentro del curso de la parasitosis se detectan por primera vez anticuerpos.

Determinar cuales son los primeros antígenos que se reconocen en extracto soluble antigénico y en los productos de excreción y secreción de la larva infectiva durante el curso de la parasitosis en el modelo experimental.

Establecer una técnica inmunoenzimática para la detección de antígenos circulantes de la larva infectiva en triquinelosis experimental.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 SUEROS PARA EL ESTUDIO DE REACCIONES CRUZADAS

Para determinar la existencia de reacciones cruzadas entre un extracto antigénico de la larva infectiva de *T. spiralis* y los sueros de pacientes con diferentes enfermedades, se emplearon 57 sueros de personas sin antecedentes clínicos de triquinosis, 25 de pacientes con triquinosis confirmada por serología, 31 de casos con brucelosis, 17 de oncocercosis, nueve de cisticercosis, 12 de fiebre tifoidea, ocho de entamoebosis, 13 de toxoplasmosis, una de tricocefalosis, 18 de ascariosis y 16 sueros positivos a la prueba de reacción febril (aglutinación para detectar anticuerpos anti-*Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A y B, *Brucella abortus* y rickettsiosis; cuadro 1). Los sueros de los pacientes se obtuvieron después de considerar que la infección fue diagnosticada por examen clínico y confirmada por pruebas de laboratorio. Personal calificado, de los centros de atención, tomó la muestra y separó el suero. Cada suero se identificó convenientemente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuadro 1. Procedencia de los sueros de pacientes con diferentes enfermedades

Grupo	Número de sueros	Procedencia
siero humano normal	57	INDRE-SS, DGSPDF-DF
triquinosis	25	INDRE-SS
brucelosis	31	INDRE-SS, CMR-IMSS
cisticercosis	9	INDRE-SS
oncocercosis	17	A y G
fiebre tifoidea	12	CMR-IMSS
toxoplasmosis	16	INP-SS
entamoebosis	8	INP-SS
tricocefalosis	1	INP-SS
ascariosis	18	INP-SS
reacción febril	16	HJ-SS
total	210	7 instituciones

A y G, sueros donados por los Dres. Añan (Escuela de Medicina Tropical, Liverpool) y Lujan (Universidad del Valle, Guatemala).
 CMR-IMSS, Centro Médico la Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social.
 DGSP-DF, Centro de Salud "M. González" de la Dirección General de Salud Pública del Distrito Federal.
 HJ-SS, Hospital Juárez de la Secretaría de Salud.
 INDRE-SS, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos de la Secretaría de Salud.
 INP-SS, Instituto Nacional de Pediatría de la Secretaría de Salud.

4.2 POBLACION DEL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

Ubicación del municipio

El municipio de Cerritos, San Luis Potosí, se localiza en las coordenadas geográficas latitud norte 22°15' a 22°36', longitud oeste 100°01' a 101°31' a una altura de 1,553 metros sobre el nivel del mar. Colinda al norte con el municipio de Guadalcázar, al sur con Villa Juárez, al este con Ciudad del Maíz, al oeste con Villa Hidalgo, al suroeste con Armadillo y San Nicolás Tolentino. Cuenta con 39 localidades, de las cuales las más importantes por su población son: Cerritos, Joya de Luna, Ojo de Agua, Derramaderos, El Sauz, San Pedro, Palo Seco, Mezquites, Tepetate, San Bartolomé, Puerta del Río, El Tepozán, Estación Montaña y Estación Villar (revisado en Alcántara, 1995).

Sueros del estudio epidemiológico

Los sueros se obtuvieron a partir de un muestreo aleatorio de voluntarios instruidos en el estudio, residentes de la población de Cerritos por más de un año, excluyendo a las personas menores de 14 años. La toma de muestra se llevó a cabo de manera domiciliaria y en las secundarias y centros de salud de las diferentes localidades. El cálculo para estimar el tamaño de la muestra representativa de la población, lo realizó el epidemiólogo Juan Aranda¹, mediante el uso del programa epidemiológico Epi-Info (Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, CDC), quien estimó que la población residente era de 14,000 habitantes, de acuerdo al censo de Población y Vivienda de 1993, suponiendo una prevalencia de triquinosis igual al 2%, la mitad de la prevalencia reportada en los estudios epidemiológicos realizados por Martínez-Marañón en cadáveres (1974). El tamaño muestral fue de 800 participantes y se obtuvieron 954 sueros.

¹ Juan Aranda, M. C., epidemiólogo de la Subjefatura de Servicios de Salud Pública del IMSS.

Los sueros se colectaron por el epidemiólogo, quien aplicó un cuestionario a cada uno de los participantes. El cuestionario, además de contemplar datos de identificación, características de la vivienda y síntomas sugerentes de la parasitosis, también consideró algunos eventos que se asocian a la transmisión de parásitos. Esta encuesta se levantó con la finalidad de buscar alguna asociación entre la positividad al inmunoensayo y algún evento socioeconómico o biológico, lo que llevaría a proponer cual o cuales son factores de riesgo que se asocian al contacto con el helminto.

4.3 MANTENIMIENTO DE *Trichinella spiralis*

La cepa de *Trichinella spiralis* se mantuvo en ratas macho Wistar de 3 meses de edad y 300 gramos de peso, las cuales fueron donadas por el vivario de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Los animales se hospedaron en jaulas de plástico de 1.20 m x 0.70 m x 0.40 m con aserrín estéril; se alimentaron *ad libitum* con agua y alimento condensado ambos estériles.

4.4 INFECCIONES EXPERIMENTALES Y TRIQUINOSCOPIA

Para el estudio de la cinética, se seleccionaron 21 ratas de la misma edad (3 meses) y peso (300 gramos) y se dividieron en tres grupos; cada grupo fue inoculado por vía oral con 3,000, 5,000 ó 7,000 L₁, obtenidas a partir de la digestión del músculo esquelético de una rata infectada previamente. Una rata sin inocular fue colocada dentro de cada una de las cajas de los grupos experimentales, como testigo negativo. Las ratas se sangraron cada tercer día por punción cardíaca durante ocho semanas, tomando un mililitro en cada ocasión. Una vez que se cumplieron 50 dpi, cada una de las ratas se anestesió con cloroformo y se sangraron a blanco por punción cardíaca. Para realizar la triquinoscopia a cada animal se le retiró un gramo de diafragma, el cual se comprimió entre dos vidrios de 10cm x 5cm x 0.2cm y se observó en un microscópio estereoscópico a 100X para contar el número de larvas presentes en todos los campos.

4.5 DIGESTION ARTIFICIAL

Para realizar el diagnóstico etiológico mediante la digestión artificial, se separó un gramo de diafragma y un gramo de músculo intercostal izquierdo de cada animal. El excedente de músculo esquelético y huesos se pesaron para procesarlos para obtener larvas infectivas. La piel, la cabeza y las vísceras se incineraron.

Se mezclaron 0.1 g de pepsina, 0.1 ml de HCl con una pureza de 38% (densidad 1.19 a 25°C) y 10 ml de agua destilada por cada gramo de carne (fragmentos de aproximadamente 0.3 cm³) y se agitaron de manera continua durante 1 h a 37°C. Luego, el material digerido se filtró a través de una gasa colocada en la boca de una copa de precipitación. Después de 30 minutos se colectaron las larvas sedimentadas, las cuales se lavaron varias veces con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con NaCl 0.015 M pH 7.2 (PBS). Para descartar el sobrenadante, se centrifugó a 1,613 gravedades durante 5 min a temperatura ambiente; con una pipeta pasteur se extrajo el excedente de tejido. Finalmente, las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 80%) y se dejaron reposar por 15 min para purificarlas de los restos de tejido de la rata. Las larvas se obtuvieron de la interfase de 20-40% y se repitieron los lavados con PBS para eliminar el exceso de dextrosa. Las larvas se suspendieron en 10 ml de PBS y se tomaron 10 µl para contarlas, el promedio de tres cuentas se intrapólo para conocer el número total de larvas.

4.6 PREPARACION DEL EXTRACTO SOLUBLE ANTIGENICO

El antígeno de *Trichinella spiralis* es un extracto soluble total de la larva infectiva (ESA); para preparar el antígeno, se aislaron mediante la digestión artificial del músculo esquelético de una rata infectada experimentalmente, doscientos cincuenta mil larvas L₁, las cuales se suspendieron en 4.0 ml de tris hidroximetil aminometano (tris-base; Bio Rad) 10 mM pH 8, que contenía 200 µg de L-1-tosilamida 2-feniletíl clorometil cetona (TPCK; Sigma), 200µg de N-α-p-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK; Sigma) y 40µl de fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF; Lakeside) 100 mM.

Las larvas se homogenizaron con un triturador de tejidos manual en frío durante 15 min, se agregaron 960 μ l de desoxicolato de sodio (Gibco) 10% en tris-base 10 mM pH 8 y se homogenizó durante 15 min más. Se dejó reposar en frío durante 20 min y finalmente se centrifugó a 15,000 xg a 4°C durante 30 min. Se tomó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas mediante el basado en el método colorimétrico de Bradford. El antígeno se almacenó a -20°C y luego a -70°C hasta su uso.

4.7 PRODUCTOS DE EXCRECION Y SECRECION DE LA LARVA INFECTIVA

Las larvas se aislaron por digestión artificial con pepsina-HCl 1% como se hizo para el ESA; después de contarlas y purificarlas se hicieron cinco lavados con PBS estéril que contenía una mezcla de antibióticos (500 U/ml de penicilina y 500 μ g/ml de estreptomycin por litro de PBS), centrifugando a 1,613 xg durante 5 min a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante en cada ocasión. Después, se hicieron dos lavados con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin por litro de medio.

Se cultivaron 10,000 larvas en 100 μ l de medio de cultivo por pozo en placas para cultivo de 96 pozos (Corning), a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 48 h. Se revisó al microscopio diariamente el cultivo para verificar que no existiera contaminación bacteriana; cada 24 h el medio de cultivo se recuperaba según virara de naranja a ambar y se sustituyó con medio fresco. La recuperación de medio se realizó de cuatro a cinco veces, dependiendo de la motilidad e integridad de las larvas.

Todo el medio recuperado se juntó y concentró por ósmosis contra azúcar, luego se dializó contra PBS por una noche y se determinó concentración de proteínas. Se adicionaron 200 μ g de TPCK, 200 μ g de TLCK y 40 μ l PMSF por cada 4 ml de PES. El antígeno se almacenó primero a -20°C y luego a -70°C hasta su uso.

4.8. TECNICAS INMUNOENZIMATICAS

4.8.1 Ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos

Esta técnica se realizó de acuerdo a la descrita por Voller *et al.* (1974) y modificada por Alcántara *et al.* (1989) para el diagnóstico de triquinelosis humana. Los pozos de las placas de ELISA (Costar) se sensibilizaron toda una noche a 4°C con 100 µl por pozo de una solución de antígeno diluido en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Para el ELISA/ESA, el antígeno ESA se diluyó a 5 µg/ml y, para el ELISA/PES, los PES se diluyeron a 1 µg/ml.

Entre cada incubación los pozos se lavaron con PBS-tween 200 µl/pozo, cuatro veces durante cuatro minutos en cada ocasión. Los sitios libres de los pozos, se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (Sigma) diluida al 1% en PBS-tween durante 2 h a 37°C.

Posteriormente se colocaron 100 µl/pozo de cada suero problema así como los de los sueros testigo negativos y positivos por duplicado a una dilución 1:2000 en PBS-Tween y se incubaron durante 2 h a 37°C.

Se colocaron 100 µl/pozo de un conjugado apropiado, según el suero y se incubó al 37°C durante 2 h; así, para el estudio de las reacciones cruzadas, se emplearon anticuerpos de chivo anti-IgG humana acoplados con peroxidasa (KPL); para el estudio epidemiológico se emplearon anticuerpos de chivo anti-IgG humana acoplados con fosfatasa alcalina (Sigma); para el curso temporal de anticuerpos en rata se emplearon anticuerpos de conejo anti-IgM de rata acoplados con peroxidasa (Sigma) y anticuerpos de conejo anti-IgG de rata acoplados con peroxidasa (Sigma). Para conocer el título de los sueros de los conejos hiperinmunes, se emplearon anticuerpos de mono anti-IgG de conejo acoplados con peroxidasa (Jackson Laboratories).

Para revelar la presencia de peroxidasa, se agregaron, 100 µl/pozo de una solución de cromógeno que contenía 100 µl de H₂O₂ (Merck) al 1.2%, 5 mg de orto-fenilendiamina (Sigma), 500 µl de una solución amortiguadora de citratos 0.1M pH 5 y 10 ml de agua destilada. Se incubó a temperatura ambiente en obscuridad, la reacción se detuvo agregando 100 µl/pozo de H₂SO₄ 2 N cuando los testigos negativos empezaron a virar. La absorbancia se leyó a 490 nm utilizando un lector automático para placas de ELISA (Bio Rad).

Para revelar el conjugado de fosfatasa, se agregaron 100 μ l/pozo de una solución que contenía 7.5 ml de dietanolamina (dietanolamina al 10% 97 ml, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g y agua destilada 800 ml, pH 9.8), dos tabletas de 5 mg de p-nitrofenilfosfato (Sigma) y 2.5 ml de agua destilada. Se incubó a 37°C, durante 30 min. La reacción se detuvo agregando 100 μ l/pozo de NaOH 1 N. Los valores de absorbancia se tomaron en un lector para ELISA a 405 nm.

Para diferenciar entre muestras negativas y positivas se obtuvo un punto de corte para el estudio de reacciones cruzadas y un punto de corte para el estudio epidemiológico. El punto de corte se consideró como el promedio más tres desviaciones estándar de la absorbancia de sueros anticuerpo anti-*Trichinella* negativos (sueros humanos sanos). Todas las muestras con valores iguales o mayores al valor de corte se consideraron positivas. Para el estudio de reacciones cruzadas se emplearon 35 sueros provenientes de un centro de salud (ver cuadro 1) y para el estudio epidemiológico se emplearon 90 sueros de la muestra en estudio.

4.8.2 ELISA para captura de antígenos circulantes

Obtención de antisueros

Para obtener los anticuerpos específicos anti-larva L₁ se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda de cuatro meses de edad, uno con el ESA y otro con los PES. La primera inmunización consistió en 1 mg de antígeno diluido 1:2 en adyuvante completo de Freund (Difco), la mezcla se administró por vía subcutánea en varios puntos del lomo. La segunda inmunización se aplicó subcutáneamente una semana después y consistió en 1 mg de antígeno diluido 1:2 en adyuvante incompleto (Difco). La tercera y la cuarta semanas se administraron 500 μ g de antígeno intramuscularmente en el muslo sin adyuvante.

Se tomó sangre semanalmente durante el periodo de inmunización, para separar el suero (reposo durante 30 min a 37°C y centrifugación a 1,400 xg durante 10 min) y determinar la presencia de anticuerpos por ELISA. El criterio que se siguió para sangrar a blanco, se apoyó en una absorbancia mayor a dos Unidades de Densidad Óptica después de la cuarta inmunización, utilizando el suero a una dilución de 1:2000.

Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad

Los anticuerpos se purificaron a partir del suero hiperinmune mediante una columna de proteína A-sefarosa de 5 ml, la cual se incubó con 5 ml de suero por toda una noche a 4°C. Al día siguiente se eluyeron las proteínas con PBS pH 7.2. Fracciones de tres mililitros se leyeron en un espectrofotómetro a 280 nm; una vez eluida la fracción inespecífica, el resto se eluyó con glicina 0.1 M pH 2.5. La fracción de IgG obtenida se dializó contra PBS pH 7.2 toda una noche para eliminar el exceso de glicina. El dializado se separó en porciones pequeñas y se almacenó a -20°C y luego a -70°C hasta su uso. La pureza de la proteína se corroboró, por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y la actividad de anticuerpo por ELISA.

Acoplamiento de biotina a inmunoglobulinas

Una parte de los anticuerpos purificados se marcaron con N-hydroxisuccinimido éster de biotina (Sigma), de acuerdo al procedimiento que describen Harlow y Lane (1988); para ello, se ajustó la concentración de proteínas a 1 mg/ml y se dializó toda una noche a 4°C contra una solución de carbonatos 0.01 M, pH 8. Al día siguiente se colocaron 200 µl de biotina (2 mg/ml en dimetilsulfóxido; Sigma) por cada mililitro de anticuerpo. La reacción se efectuó en obscuridad durante 4 h en agitación continua. Después, el reactivo se dializó contra PBS toda una noche a 4°C y se almacenó primero a -20°C y luego a -70°C. La actividad del anticuerpo se corroboró por ELISA.

Captura de antígenos en suero de rata

Placas para ELISA immulon II (Dynatech), se sensibilizaron con 100 µl de una solución de anticuerpos sin marca a 25 µg/ml en un amortiguador de boratos 0.1 M pH 8.2, y se incubó toda una noche a 4°C. Después de cada incubación, los pozos se lavaron tres veces con 200 µl de NaCl 0.9% tween 20 (Sigma) 0.05%, 5 min en cada ocasión. Se bloqueó con 200 µl/pozo de albúmina sérica bovina (Sigma) al 1% en PBS-tween, a 37°C durante 1 h. Los sueros se colocaron diluidos 1:3 en PBS-tween con albúmina sérica bovina al 1% (100 µl/pozo). El testigo positivo del ensayo se constituyó a partir de un gradiente de concentración de antígeno (0.01 a 100 µg/ml) diluido en una mezcla de sueros de rata no infectadas. La placa se incubó a 4°C durante 12 h.

Se colocaron 100 μ l/pozo del anticuerpo marcado con biotina a 25 μ g/ml en PBS-tween con albúmina sérica bovina al 1% y se dejó incubar 2 h a 37°C. Después se colocaron 100 μ l/pozo de un conjugado de avidina-peroxidasa (Sigma) diluido 1:500 en PBS-tween con albúmina sérica bovina al 1% y se incubó 2 h a 37°C. El revelado de la placa se realizó utilizando el sustrato para peroxidasa que se describió anteriormente. La lectura se tomó a 490 nm.

4.8.3 Inmunoelctrotransferencia

Electroforesis en geles de poliacrilamida

El antígeno se sometió a electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 12% en condiciones reductoras, de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). Se utilizó un sistema discontinuo de dos geles; el primer gel por el que pasaba la muestra (gel superior) concentraba la muestra y el segundo (gel inferior) separaba las proteínas.

En un matraz Erlen-Meyer se mezclaron las soluciones, como se muestra en la cuadro 2, para preparar el gel separador.

Cuadro 2. Soluciones para preparar el gel separador de poliacrilamida

GEL SEPARADOR	
solución	volumen (ml)
acrilamida 30%-n,n'-metileno-bis-acrilamida 0,8%	11.00
tris hidroximetil aminometano 2 M pH 8.8	6.00
sds al 10%	0.30
agua destilada	11.75
persulfato de amonio (10 mg/ml)	0.50
n,n,n',n'-tretametilendiamina	0.030

Se colocaron aproximadamente 10 ml de esta mezcla entre dos cristales de 7.3 x 10.2 cm usando separadores de 1.5 mm de espesor, evitando la formación de burbujas. Después de la polimerización del gel, se eliminó el exceso de solución no polimerizada con papel filtro y se colocó un peine de plástico de 2 carriles, uno para el marcador de pesos moleculares (Bio-Rad) y el otro para el antígeno.

Para preparar el gel concentrador, se mezclaron en un matraz Erlen-Meyer las soluciones que enlistan en la cuadro 3.

Cuadro 3. Soluciones para preparar el gel concentrador de poliacrilamida

GEL CONCENTRADOR	
solución	volumen (ml)
acrilamida 30% - bis 0.8%	3.50
tris hidroximetil aminometano hidrocólorido 2M pH 6.8	0.65
sds al 10%	0.10
agua destilada	11.50
persulfato de amonio (10 mg/ml)	0.20
n,n,n',n'-tretametilendiamina	0.010

La mezcla se colocó sobre el gel separador, procurando evitar la formación de burbujas. Después de la polimerización se quitó el peine y se eliminó el exceso de solución no polimerizada, dejando secos los carriles para colocar las muestras.

Se emplearon 500 µg de preparación de antígeno (ESA o PES), diluidos en un volumen igual de una solución para separar las proteínas (SDS 10%, 1 ml; ácido etilendinitrilotetraacético, 7.4 mg; glicerina, 1 ml; tris hidrocólorido 2 M pH 6.8, 250 µl; azul de bromofenol y agua destilada para completar 10 ml). Cada mililitro de la solución para separar las proteínas, se mezcló con 100 µl de β-mercaptoetanol (Bio Rad) y se procedió a hervir en baño maría por 10 min.

La electroforesis se efectuó en una cámara para electroforesis Mini-Protean II (Bio-Rad), en presencia de una solución amortiguadora (tris hidroximetil aminometano, 3.6 g; glicina, 27.6 g; SDS 10%, 12 ml; agua destilada, 1,500 ml), aplicando una corriente de 10 mA por gel durante 3 h en refrigeración.

Electrotransferencia

Después de la electroforesis, la transferencia se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Towbin *et al.* (1979). El gel se colocó en un recipiente con el amortiguador de transferencia (tris hidroximetil aminometano, 3.08 g; glicina, 14.48 g; metanol, 200 ml; agua destilada, 800 ml) durante 15 min. En el mismo recipiente se colocó el papel de nitrocelulosa (NC) de 0.45 µm de poro (Schleicher and Schuell) y aditamentos de la cámara de transferencia (Sigma). La transferencia se llevó al cabo con una corriente de 400 mA, durante 70 min a 4°C.

La membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 0.3% (Merck) para observar si la transferencia de las proteínas fue adecuada y la tira con los marcadores de peso molecular se cortó; se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó con leche descremada (Sveltes, Nestle®) al 5% en PBS-tween por toda una noche a 4°C. Después se lavó tres veces con PBS-tween y dos veces con PBS durante cinco minutos en cada ocasión. Se cortaron tiras de 0.4 mm de ancho y cada una se incubó con cada uno de los sueros, diluidos en PBS-tween durante 2 h a temperatura ambiente en agitación continua, en una cámara para microincubaciones (Bio Rad). Los sueros humanos se usaron a una dilución de 1:50 y los sueros de las ratas a 1:500. Después de los lavados, las tiras se incubaron con el conjugado apropiado: anticuerpos de chivo anti-gamaglobulinas totales de humano acoplados con peroxidasa (Sigma) diluidos 1:1000 en PBS-tween; o anticuerpos de conejo anti-gamaglobulinas totales de rata acoplados con peroxidasa (Sigma) diluidos 1:2000 en PBS-tween.

Después de los lavados, la reacción se reveló empleando 50 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma) diluido en 10 ml de metanol, 50 ml de PBS y 5 μ l de H₂O₂ al 30%. Una vez que aparecieron las bandas, el substrato se retiró y la reacción se detuvo con agua destilada. Las tiras se secaron sobre papel filtro.

4.9 ANALISIS ESTADISTICO

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el programa de computo epidemiológico Epi-Info (Centro para el Control de Enfermedades, CDC; Atlanta). En el estudio epidemiológico, los eventos biológicos y/o socioeconómicos se asociaron con la presencia de anticuerpos, mediante la razón de momios y las pruebas de Fisher exacta o la de χ^2 corregida por Mantel-Haenszel.

6. RESULTADOS

6.1 PRODUCCION DE ANTIGENOS

Se produjeron un extracto soluble antigénico (ESA) y los productos de excreción y secreción (PES) de la larva infectiva para ser utilizados como antígenos en las técnicas inmunoenzimáticas. El corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida-SDS al 12% del ESA y de los PES, reveló la presencia de más de 20 bandas proteicas en la primera preparación y más de 10 en la segunda; en ambos casos, las proteínas se distribuyeron entre los 14 y 97 kDa (figura 4). En los PES se observó una banda de aproximadamente 62 kDa que, aunque muy abundante, no fue antigénica.

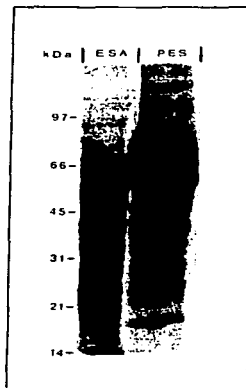


Figura 4. Perfil proteico de componentes del extracto soluble antigénico y los productos de excreción y secreción de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*. Las proteínas del extracto soluble antigénico (ESA) y de los productos de excreción y secreción de la larva infectiva, se separaron en geles de poliacrilamida SDS al 12%, de acuerdo a lo descrito en la sección de "Materiales y Métodos". Las proteínas se tiñeron, primero, con azul de Coomassie (Bio Rad) y posteriormente con solución de plata (Bio Rad). El peso molecular de los marcadores empleados como estándares, se indica a la izquierda de la figura.

5.2 ESTUDIO DE REACCIONES CRUZADAS

5.2.1 Ensayo inmunoenzimático con extracto soluble antigénico

Para determinar la presencia de reacción cruzada entre el extracto soluble antigénico de la larva infectiva y muestras de suero de pacientes con diferentes enfermedades, se calculó un punto de corte (0.405) para diferenciar la muestras positivas de las negativas. Para la realización del ensayo, los sueros se diluyeron 1:2,000 y se incubaron durante dos horas a 37°C. Se observó que sólo un suero del grupo pacientes con oncocercosis (absorbancia = 0.485) reaccionó con el antígeno. Los valores de absorbancia de los sueros de los pacientes con triquinelosis fueron mayores que el valor de corte (figura 5).

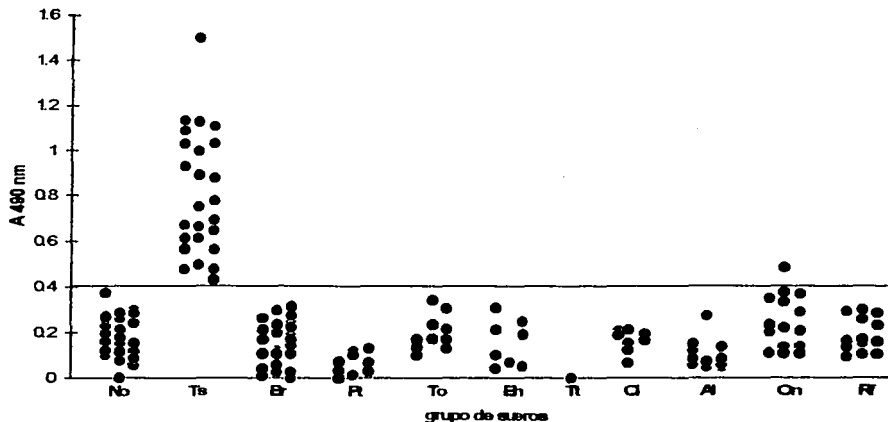


Figura 5. Valores de absorbancia obtenidos en ELISA con muestras de sueros de pacientes con diferentes enfermedades. Las muestras de sueros de los individuos incluidos en este estudio se analizaron empleando un extracto crudo de la larva L₁ de *Trichinella spiralis*. La línea continua representa el valor de corte. Sueros de personas sanas, No; sueros de pacientes con triquinelosis, Ts; con brucelosis, Br; con fiebre tifoidea, Ft; con toxoplasmosis, To; con entamebiosis, Eh; con tricocéfalois, Tt; con cisticercosis, Ci; con ascariosis, Al; con oncocercosis On. Sueros positivos a las pruebas febriles, Rf.

5.2.2 Reactividad de los sueros analizados por IET

De los sueros evaluados por ELISA, se tomaron 36 de personas sanas, 20 de individuos con triquinosis, 22 con brucelosis, 17 con oncocercosis, 5 con cisticercosis, 7 con fiebre tifoidea, 8 con entamoebiosis, 16 con toxoplasmosis, uno con tricocefalosis, 20 con ascariosis y 16 sueros positivos a la prueba de reacción febril. Los sueros se diluyeron 1:50 y se incubaron con las tiras de nitrocelulosa durante dos horas a temperatura ambiente. Los sueros de los pacientes con triquinosis reconocieron un conjunto de bandas cuyos pesos moleculares oscilaron entre los 38 y 104 kDa. Los sueros de los pacientes con ascariosis y con oncocercosis reaccionaron heterogéneamente con el antígeno: los primeros reconocieron bandas cuyo peso molecular fluctuaban entre los 50 y 100 kDa y los segundos entre los 70 y 100 kDa; ninguno de estos sueros reconoció el patrón antigénico que caracteriza a la respuesta humoral de los pacientes con triquinosis. De manera particular, el suero ELISA-positivo reconoció una banda de aproximadamente 77 kDa (figura 6, segunda tira del grupo "On") y un suero del grupo de los pacientes con ascariosis (figura 6, primera tira del grupo "As") reconoció de manera notoria tres bandas: 92, 75 y 70 kDa. No se detectaron bandas en los sueros de los pacientes con otras enfermedades ni en los sueros de las personas sanas (figura 7).

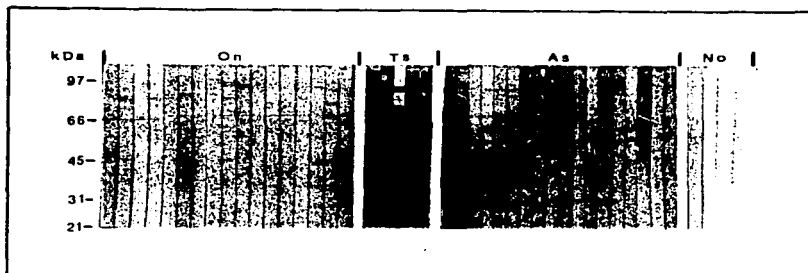


Figura 6. Patrón de reconocimiento de antígenos de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* por sueros de individuos con oncocercosis y con ascariasis. La reactividad de las muestras de suero se analizó por IET de acuerdo a lo descrito en la sección de "Materiales y Métodos". Sueros de pacientes con oncocercosis (On), con triquinelosis (Ts) y con ascariasis (As); el grupo testigo negativo estuvo constituido por sueros de personas sanas (No). La segunda tira de izquierda a la derecha corresponde al suero ELISA/ESA positivo. A la izquierda se indican los pesos moleculares de referencia.

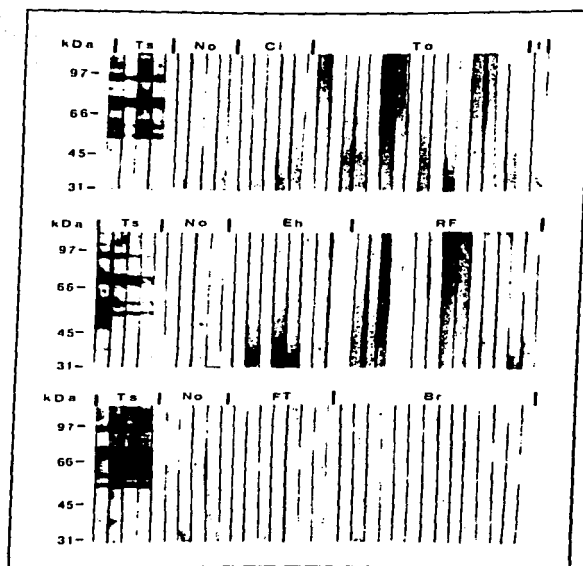


Figura 7. Patrón de reconocimiento de antígenos de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* por sueros de individuos con diferentes infecciones. La reactividad de los sueros se analizó por IET, de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección de "Materiales y Métodos". Sueros de pacientes con triquinelosis (Ts), con brucelosis (Br), con fiebre tifoidea (FT), con toxoplasmosis (To), con entamoebiosis (Eh), con cisticercosis (Ci), con tricocefalosis (t); el grupo testigo negativo estuvo constituido por sueros de personas sanas (No). A la izquierda de cada panel se indican los pesos moleculares de referencia.

5.3 ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

5.3.1 Detección de anticuerpos por ELISA empleando ESA

Por este ensayo se encontró que 18 de 954 muestras reaccionaron con el antígeno. En la figura 8 se muestra la distribución de la frecuencia de las absorbancias de los 954 sueros, en donde se observan dos poblaciones, la primera de mayor tamaño que corresponde a los sueros cuyas absorbancias eran menores al punto de corte (0.1435); la segunda corresponde al grupo de los 18 sueros positivos. Con estos datos se calculó una prevalencia de anticuerpos anti-*Trichinella* del 1.9% (figura 8).

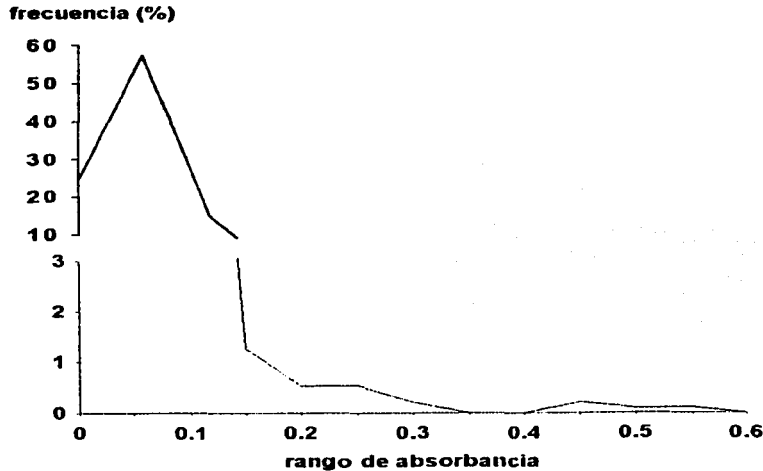


Figura 8. Distribución de la frecuencia de la absorbancias a 405 nm de 954 sueros provenientes del municipio de Cerritos, SLP. Las muestras de suero se analizaron por ELISA, empleando un extracto crudo (ESA) de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*. Dieciocho sueros reaccionaron con este extracto (Absorbancia > 0.1435).

6.3.2 Reactividad de los sueros positivos hacia el ESA por IET

La reactividad de los 18 sueros ELISA/ESA positivos junto con el 10% de los sueros ELISA/ESA negativos (94 sueros seleccionados de manera aleatoria) se evaluó por IET, confrontandolos con el ESA (figura 9). Los sueros positivos reaccionaron con bandas de entre 38 y 104 kDa, las cuales correspondieron con el peso molecular de las bandas antigénicas del patrón que caracteriza la respuesta humoral de los pacientes con triquinosis, descrito previamente por Alcántara y Correa (1993). El cuadro 4, muestra que el mayor número de bandas reconocidas por los sueros positivos fue de nueve y el menor de dos. No se encontró correlación entre los valores de absorbancia de las muestras ELISA/ESA positivas y el número de bandas reconocidas ($r^2=0.164$). Sólo un suero del grupo de negativos reaccionó con el antígeno, el cual reconoció una banda de 59 kDa (figura 9; carril 6 de izquierda a derecha del grupo "negativos").

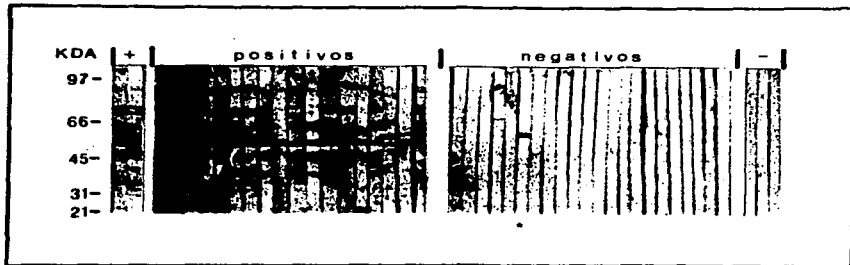


Figura 9. Inmunoelctrotransferencia de los sueros ELISA/ESA positivos y de algunas muestras ELISA/ESA negativas. La reactividad de los sueros se analizó, empleando un extracto crudo de la larva infectiva de *Trichinella spiralis*. Los sueros ELISA/ESA positivos se muestran en el grupo "positivos", algunos sueros del grupo ELISA/ESA negativos se agrupan en "negativos". Del lado izquierda de la figura se muestran dos sueros de pacientes con triquinelosis (+) y del lado derecho tres sueros de personas sanas (-). En el grupo "negativos" se observa que un suero reconoció una banda de 59 kDa (carril 6, asterisco). Los pesos moleculares de referencia se indican a la izquierda de la figura.

Cuadro 4. Número y peso molecular de las bandas reconocidas en IET/ESA por los sueros del estudio epidemiológico en relación a su absorbancia a 405 nm en ELISA/ESA

ELISA/ESA	SUERO	BANDAS RECONOCIDAS EN EL ESA POR IET	TOTAL DE BANDAS	ABSORBANCIA A 405nm
positivos	97	93,59,54,52,50,42	6	0.211
	100	66,59,54,50	4	0.183
	139	77,66,54	3	0.167
	173	63,54	2	0.535
	211	73,63,59,54,	4	0.178
	296	66,59,54,50	4	0.358
	358	77,73,66,54,50,42,38	7	0.776
	362	77,73,66,54,50,42,38	7	0.559
	465	77,73,63,54,38	5	0.337
	478	63,54,50,42,38	5	0.259
	558	93,77,73,63,59,54,52,50,38	9	0.158
	559	93,77,73,63,38	5	0.294
	581	54,42	2	0.337
	623	54,50	2	0.180
	659	15,54,50,42,	4	0.201
	665	59,54,52	3	0.468
	671	66,52	2	0.284
	705	63,52	2	0.281
	negativos	320	54	1

ELISA= ensayo inmunoenzimático

ESA= extracto soluble antigénico

IET= inmunoelectrotransferencia

Con base en los datos del cuadro 4, se construyó un gráfico de frecuencia de reconocimiento de bandas, en el que se observa que el 83.3% de los sueros ELISA/ESA positivos reconocieron la banda de 54 kDa. La banda de 93 kDa fue la menos reconocida (16.6%), mientras que la banda de 104 kDa, no fue reconocida (figura 10).

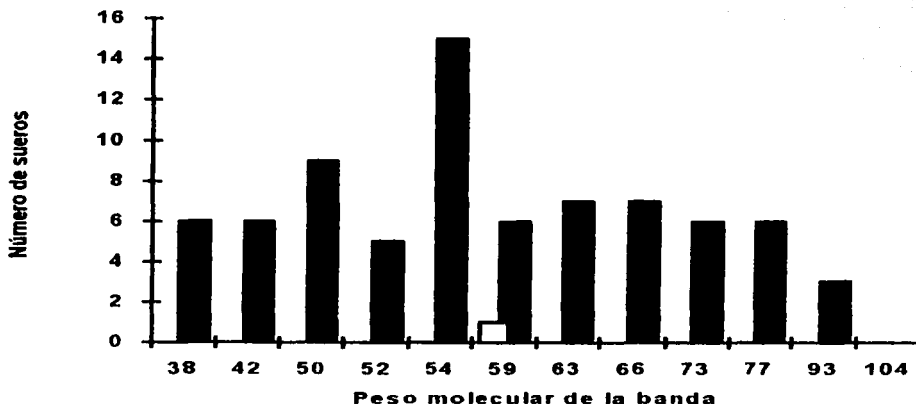


Figura 10. Frecuencia de reconocimiento de antígenos de *Trichinella spiralis* por IET. El análisis de frecuencia se realizó con base en el número de sueros que reconocieron una determinada banda en el extracto crudo de la larva L₁. Las barras oscuras corresponden al grupo de sueros ELISA/ESA positivos (n=18), las barras blancas corresponden al grupo de sueros ELISA/ESA negativos (n=94).

La sensibilidad y la especificidad de la IET, con respecto al ELISA empleando ESA fue del 100 y del 99%, respectivamente ya que, por un lado, todos los sueros ELISA/ESA positivos reconocieron al antígeno y, por el otro, no se descarta la presencia de anticuerpos de reacción cruzada en el suero ELISA/ESA negativo. Con estos resultados, se calculó que la prevalencia de anticuerpos sería similar a la que se calculó por ELISA (cuadro 6).

5.3.3 Reactividad de los sueros positivos hacia los PES por ELISA

Con esta técnica se analizaron los 18 sueros ELISA/ESA positivos y 10% de las muestras ELISA/ESA negativas, 10 sueros del primer grupo fueron positivos y ninguno de los sueros que integró el segundo grupo fue positivo. No hubo correlación entre las absorbancias de las muestras ELISA/ESA positivas y las ELISA/PES positivas ($r^2=0.55$). Para este ensayo, se calculó una sensibilidad del 55.6% y una especificidad del 100% con respecto al ELISA/ESA. Con esta combinación de técnica y antígeno se calculó una seroprevalencia de 1.0% (cuadro 6).

5.3.4 Reactividad de los sueros positivos hacia los PES por IET

Quince de los 18 sueros ELISA/ESA positivos, reconocieron un duplete de 59 y 54 kDa y/o una banda de 38 kDa; el suero IET/ESA positivo del grupo ELISA/ESA negativos reconoció una banda de 38 kDa. El resto de los sueros del grupo negativo no reaccionó con los PES (figura 11).

Para analizar la frecuencia de reconocimiento de las bandas antigénicas de los PES en IET se elaboraron la cuadro 5 y la figura 12, en las cuales se observó que el 82% de los sueros positivos por IET/PES reaccionaron con un duplete de 54 y 59 kDa, aunque solamente el 45% de ellos reconoció de manera exclusiva este duplete. No hubo correlación entre los valores de absorbancia por ELISA/PES de las muestras y el número de bandas reconocidas por IET/PES.

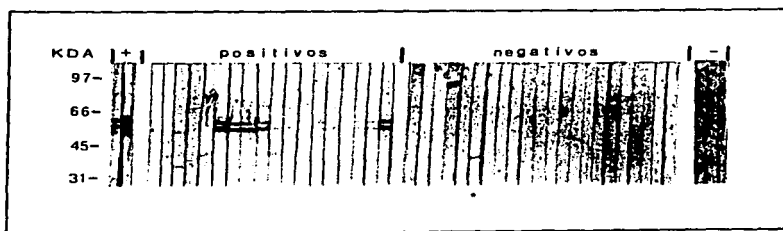


Figura 11. Patrón de reconocimiento antigénico de los productos de excreción y secreción de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* por los sueros ELISA/ESA positivos y los sueros ELISA/ESA negativos. La reactividad de los sueros se analizó por IET, de acuerdo a la técnica descrita en la sección de "Materiales y Métodos". Los sueros ELISA/ESA positivos se agruparon como "positivos" y solo se muestran alguno de los sueros ELISA/ESA negativos, agrupados como "negativos". En la figura se observa que un suero negativo reaccionó con una banda de 38 kDa (carril 6 de izquierda a derecha). Del lado izquierdo de la figura se observa la reacción de dos sueros de pacientes con triquinelosis (+) y del lado derecho la reacción de cinco sueros de personas sanas (-). El peso molecular de las proteínas que se utilizaron como estándar se indica a la izquierda de la figura.

Cuadro 5. Número y peso molecular de las bandas reconocidas en IET/PES por los sueros del estudio epidemiológico en relación a su absorbancia a 405 nm en ELISA/PES

MUESTRA ELISA/ESA	SUERO	BANDAS RECONOCIDAS EN EL ESA POR IET/ES	TOTAL DE BANDAS	ABSORBANCIA A 405nm ELISA/ES
positivos	97	59,54	2	0.062
	100	59,54	2	0.008
	139		0	0.063
	173	59,54	2	0.446
	211	59,54	2	0.062
	296	38	1	0.223
	356		0	0.269
	362	38	1	0.346
	465	63,59,54	3	0.162
	476	63,59,54,38	4	0.046
	558	63,59,54	3	0.123
	559	63,59,54	3	0.031
	581		0	0.138
	623		0	0.146
	659	50	1	0.000
	665	42,38	2	0.023
671	59,54	2	0.254	
705	42,38	2	0.146	
negativos	320	38	1	<0.092

ELISA= ensayo inmunoenzimático
 ESA= extracto soluble antigénico
 IET= inmunoelectrotransferencia

Como solo 15 de 18 sueros ELISA/ESA positivos, se confirmaron en IET/PES, se estimó que la correlación entre estos ensayos/antígenos es del 83%. El suero ELISA/ESA negativo que reconoció una banda en el IET/ESA, reconoció una banda de 38 kDa por IET/PES (figura 11; tira 6 de izquierda a derecha del grupo "negativos"), con lo cual se calculó que la especificidad del ensayo sería del 99%. Con estos datos se calculó que la prevalencia de anticuerpos sería del 1.6% (cuadro 6).



Figura 12. Frecuencia de reconocimiento de antígenos de los productos de excreción y secreción de la larva infectiva *Trichinella spiralis* por IET. El análisis de frecuencia se realizó con base en el número de sueros que reconocieron una determinada banda en los productos de excreción y secreción. Las barras oscuras corresponden al grupo de sueros ELISA/ESA positivos (n=18), las barras blancas corresponden al grupo de sueros ELISA/ESA negativos (n=94).

Cuadro 6. Prevalencia de anticuerpos α -*Trichinella* en Cerritos, SLP empleando dos preparaciones antigénicas de la larva infectiva y dos técnicas inmunoenzimáticas.

ensayo/antígeno	sensibilidad	especificidad	prevalencia
ELISA-ESA	-	-	1.9
ELISA-PES	55.56	100	1.0
IET-ESA	100	98.89	1.9
IET-PES	83	98.89	1.6

Los datos se presentan en porcentaje

ELISA= ensayo inmunoenzimático

ESA= extracto soluble antigénico de la larva infectiva;

IET= inmunoelectrotransferencia

PES= productos de excreción y secreción de la larva infectiva

5.3.5 Análisis de los factores de riesgo

Los factores de riesgo que se asociaron a la presencia de anticuerpos detectados por ELISA/ESA fueron **género femenino y consumo de moronga** (cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de los factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos

factor de riesgo	frecuencia ¹		razón de momios	95% límite de confianza	p
	femenino	masculino			
género					
	2.36%	0.45%	5.66	0.79-114.7	0.04*
consumo de moronga	expuestos	no-expuestos			
	3.75%	1.16%	3.31	1.19-9.29	0.008**

*Fisher exacta

** χ^2 corregida por Mantel-Haenzel

¹ Frecuencia se define como el porcentaje de muestras positivas para el ELISA de detección de anticuerpos por grupo de riesgo. Para calcular la frecuencia se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia} = \frac{\text{número de muestras positivas del grupo de riesgo}}{\text{número total de muestras del grupo de riesgo}} \times 100$$

5.4 DETERMINACION DE ANTICUERPOS Y ANTIGENOS EN EL MODELO DE TRIQUINELOSIS EXPERIMENTAL

5.4.1 Detección de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* por ELISA

Se infectaron tres grupos de 7 ratas cada uno, con diferentes dosis (3,000, 5,000 y 7,000 L₁); no se registró mortalidad en los grupos infectados con 3,000 y 5,000 L₁, aunque el testigo negativo del segundo grupo falleció a los 35 dpi. En el grupo infectado con 7,000 L₁, se registró una mortalidad del 57% (4 de 7), que ocurrió durante las dos primeras semanas de infección. Se detectaron larvas infectivas en la rata que sirvió como testigo negativo del grupo, durante el diagnóstico etiológico.

Se determinó la cinética de aparición de anticuerpos anti-larva infectiva en los sueros de las 17 ratas sobrevivientes. Utilizando el ESA como fuente de antígeno, se detectaron anticuerpos en 16 desde los 10 dpi y en una después de los 20 dpi (figura 12 a). En las 17 cinéticas se detectaron anticuerpos de manera constante durante 50 dpi; solo en cuatro casos se observó que la absorbancia decreció después de los 60 dpi (figura 12; a, c, d y f). Utilizando los PES se detectaron anticuerpos entre los 20 y 30 dpi en 16 cinéticas y en una, los anticuerpos se detectaron antes de los 20 dpi (figura 11 c). En tres cinéticas se observó que la absorbancia decayó después de los 50 dpi (figuras 11 d y 12 a y c).

Las ratas testigo negativo de los grupo infectados con 3,000 L₁ (figura 11 h) y con 5,000 L₁ (figura 12 h) no respondieron contra ninguno de los dos antígenos; la rata testigo negativo del grupo infectado con 7,000 L₁ (figura 13 f) respondió contra ambos antígenos, se detectaron anticuerpos IgG e IgM anti-ESA desde los 10 y 30 dpi respectivamente. Los anticuerpos anti-PES, se detectaron después de los 30 dpi.

En cuanto a la clase de anticuerpos detectados, no hubo diferencia entre el tiempo de aparición de IgM y de IgG, pero se observó que en el 76% de las cinéticas, la mayor absorbancia correspondió a la presencia de IgM anti-ESA, en segundo lugar IgG anti-ESA, en tercero IgM anti-PES y en último IgG anti-PES.

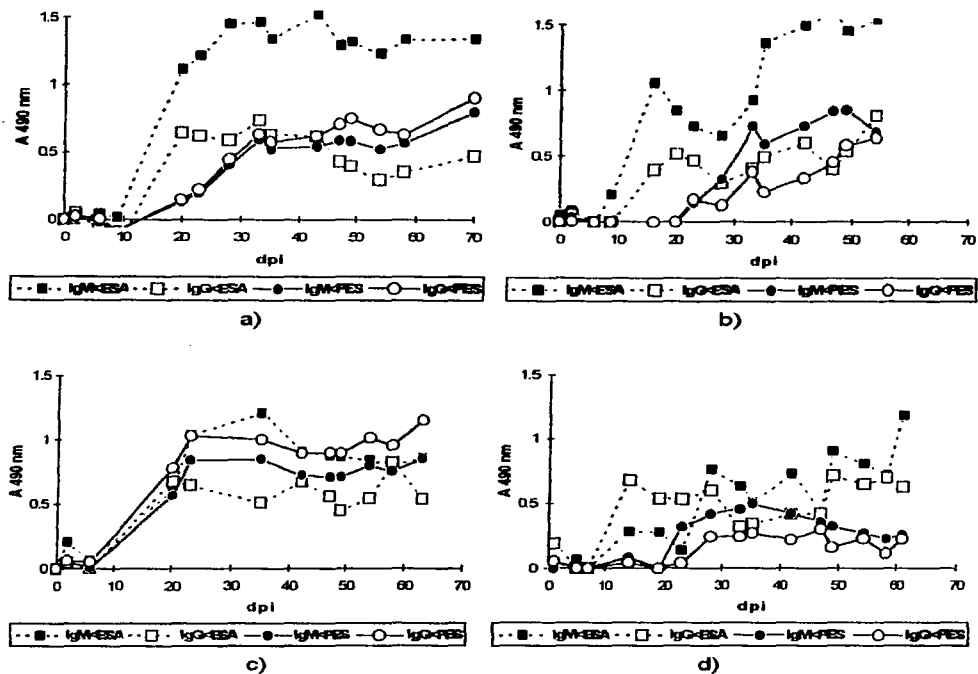


Figura 13. Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 3,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). Días *post* infección, dpi.

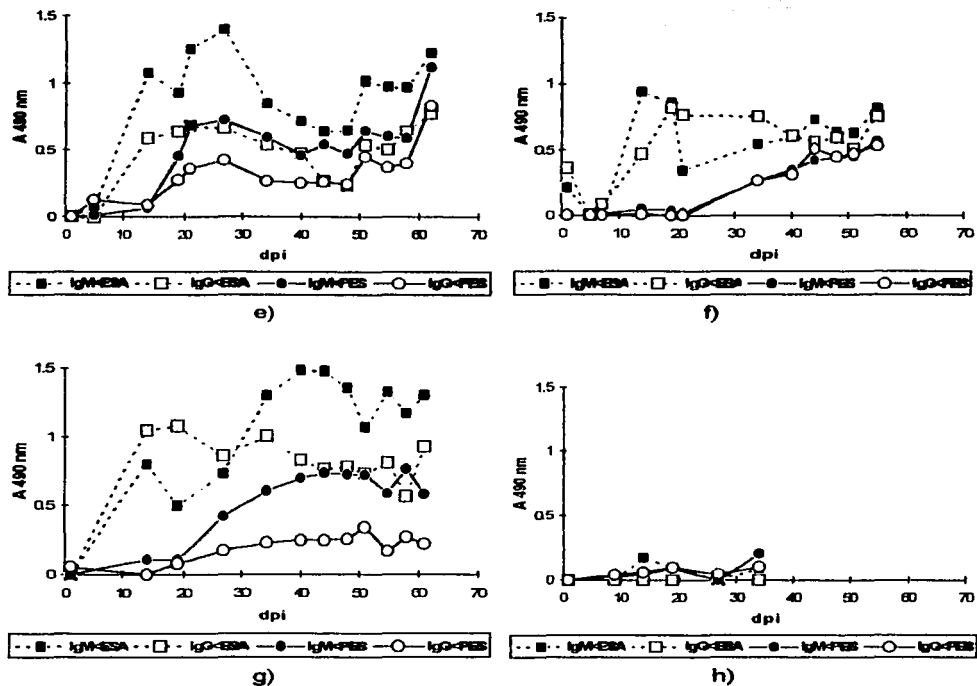


Figura 13 (continúa). Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 3,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción/secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). En el panel h se presenta el curso de la rata testigo negativo del grupo. Días post infección, dpi.

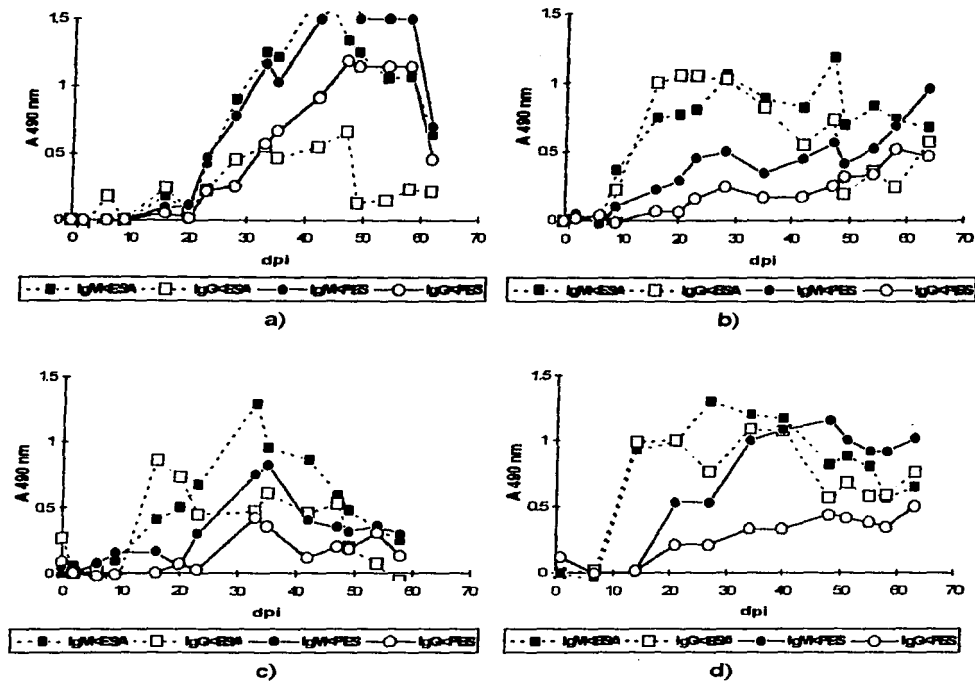


Figura 14. Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 5,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). Días post infección, dpi.

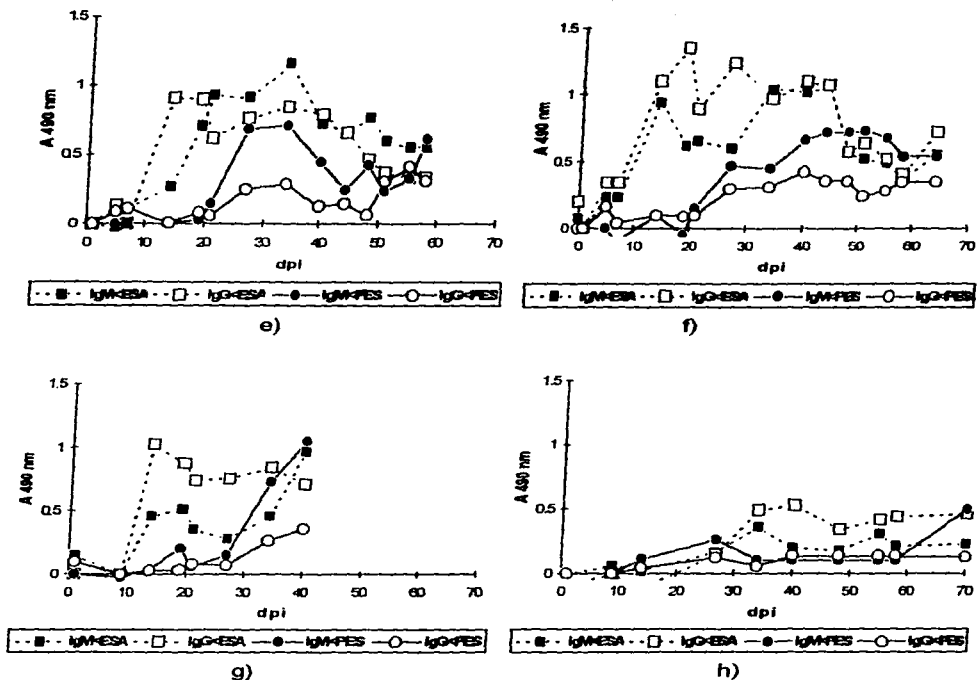


Figura 14 (continúa). Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 5,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). En el panel h se presenta el curso de la rata testigo negativo del grupo. Días post infección, dpi.

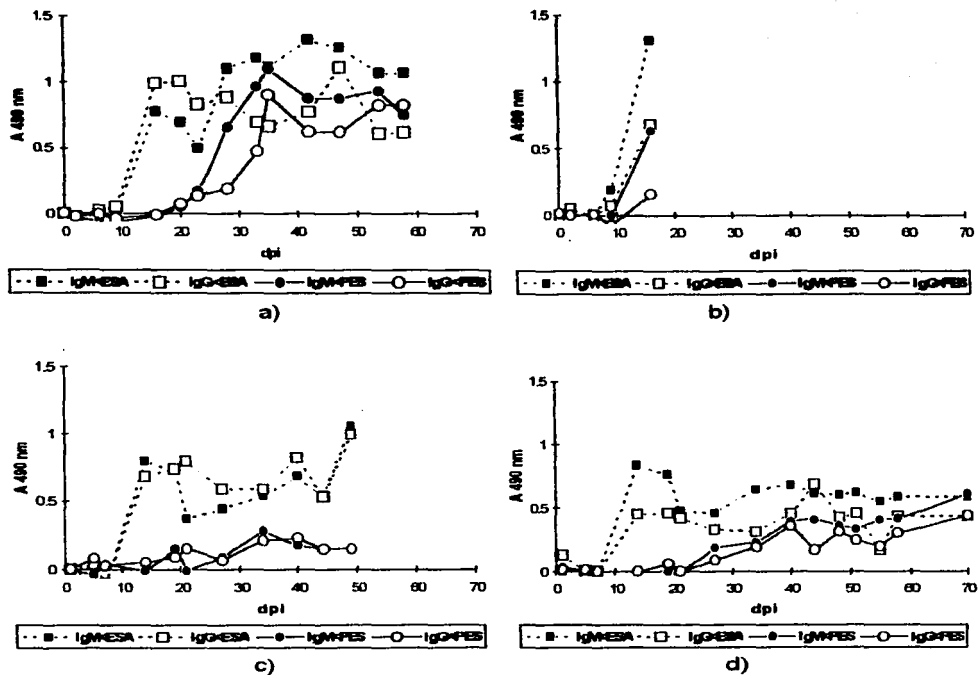


Figura 15. Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 7,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). Días *post* infección, dpi.

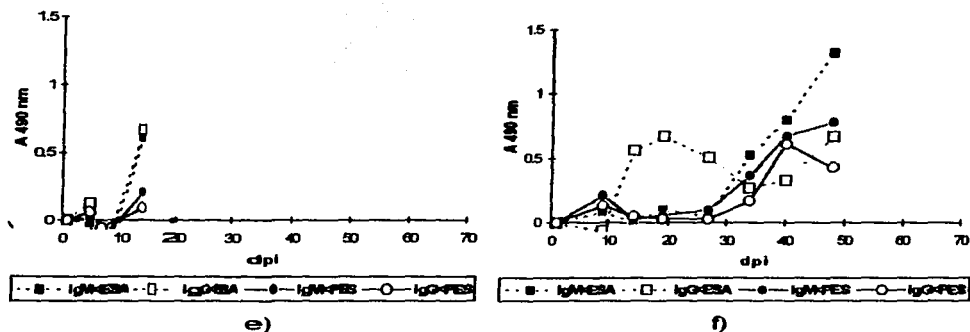


Figura 15 (continúa). Cinética de la aparición de anticuerpos en ratas macho infectadas con 7,000 L₁. Cada panel representa la cinética de una rata. Se emplearon el extracto soluble antigénico (líneas punteadas; ESA) o los productos de excreción secreción (líneas continuas; PES) de la larva infectiva, para sensibilizar el ensayo inmunoenzimático. Se detectaron anticuerpos IgM (figuras cerradas) o IgG (figuras abiertas). En el panel f) se presenta la cinética de la rata testigo negativo del grupo; en esta rata se encontraron larvas infectivas durante la inspección del músculo esquelético. Días post infección, dpi.

5. 4. 2 Detección de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* por IET

Para detectar la aparición de anticuerpos por IET se confrontaron los sueros de las ratas infectadas experimentalmente con los PES y el ESA (figura 14). No se observaron diferencias entre el reconocimiento antigénico y las dosis de infección. El reconocimiento antigénico se analizó por grupo de infección, considerando la frecuencia de reconocimiento de una banda en función de intervalos de tiempo de 4 días durante 64 dpi. Con ESA se observó que desde el día cero de la cinética, algunas bandas fueron reconocidas en diferentes porcentajes (45 kDa, 30%; 54 kDa, 30%; 63 kDa, 20%; 66 kDa, 10%; 93 kDa, 30% y 104 kDa, 20%). Entre los 10 y 20 dpi, 80% de los sueros de los grupos experimentales reconocieron las bandas anteriores y además 35% de los sueros reconocieron una banda de 38 kDa y 20% una de 59 kDa y una de 77 kDa. A los 35 dpi el 100% de los sueros reconocieron las bandas antes mencionadas. Utilizando los PES se detectaron anticuerpos a partir de los 20 dpi, reconociendo principalmente dos bandas: una de 54 y otra de 59 kDa. Después de los 30 dpi, 90% de todos los sueros reconocieron estas bandas (figura 15). La comparación de las frecuencias del reconocimiento antigénico del ESA y los PES, reveló que la cinética de las bandas de 54 y 59 kDa de los PES es similar a la cinética de las bandas de 59, 73 y 77 kDa del ESA (figura 16).

Los sueros de las ratas no infectadas, pertenecientes a los grupos de 3,000 y 5,000 L₁ administradas, no reaccionaron con los antígenos; la rata testigo negativo del grupo infectado con 7,000 L₁, reconoció cuatro bandas antigénicas (45, 54, 63 y 66 kDa) a los 14 dpi, a esta rata se le dictaminó triquinoscopia positiva y anticuerpos anti-*Trichinella* por ELISA.

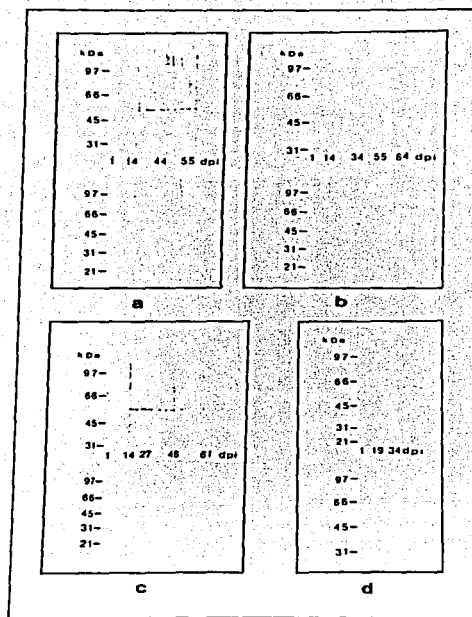


Figura 16. Patrón del reconocimiento antigénico de *Trichinella spiralis* por sueros de ratas infectadas experimentalmente. La reactividad de los sueros hacia el ESA o los PES de la larva infectiva se estimó por IET, de acuerdo al procedimiento que se refiere en la sección de "Materiales y Métodos". En la figura se muestra la reactividad de los sueros de tres ratas infectadas experimentalmente con diferentes cargas parasitarias: 3,000 L₁ (a), 5,000 L₁ (b) y 7,000 L₁ (c); en (d) se muestra la cinética de una rata no-infectada. El panel superior de cada cinética corresponde a la reacción efectuada con ESA y el panel inferior a la reacción con PES. La cinética se muestra en días post infección (dpi). Los pesos moleculares de referencia se marcan a la izquierda de cada panel.

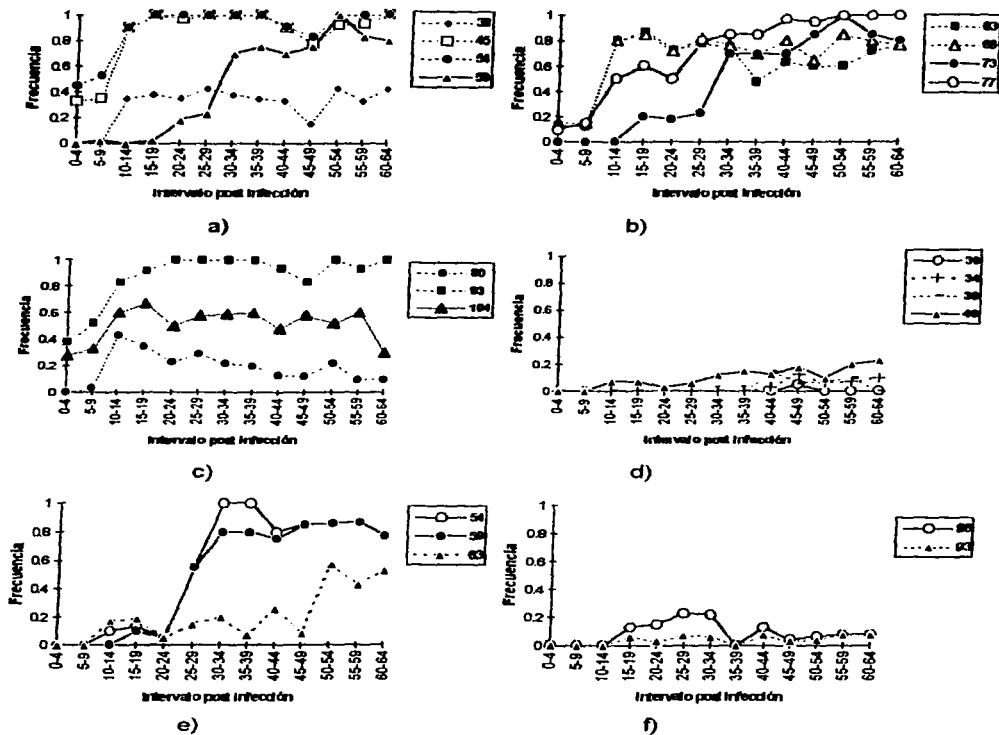


Figura 17. Frecuencia del reconocimiento antigénico de *Trichinella spiralis*. El reconocimiento antigénico del ESA y de los PES se realizó por IET, empleando 17 sueros de ratas infectadas experimentalmente y la frecuencia del reconocimiento antigénico se realizó por banda. ESA, paneles a, b y c; PES, paneles d, e y f. El peso molecular de las bandas se muestra en la parte superior derecha de cada panel.

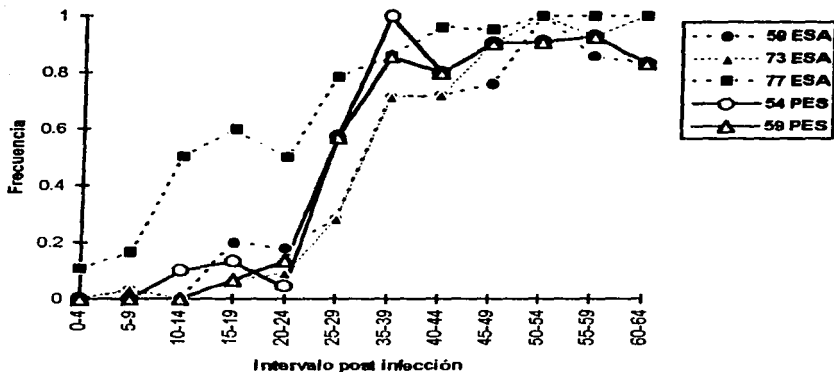


Figura 18. Comparación de la frecuencia de reconocimiento del duplete 54/59kDa de los PES y las bandas 59, 73 y 77kDa del ESA. El reconocimiento antigénico del ESA y de los PES se realizó por IET, de acuerdo a lo descrito en "Materiales y Métodos", empleando 17 sueros de ratas infectadas experimentalmente y la frecuencia de reconocimiento de las bandas de los PES se comparan con las del ESA en función del tiempo. La simbología para identificar las bandas en la figura, se muestra a la derecha del gráfico.

5. 4. 3 ELISA para la captura de antígenos en el modelo de triquinosis experimental

Se inmunizaron dos conejos Nueva Zelanda, uno con ESA y otro con los PES y a partir de los sueros hiperinmunes se purificaron las inmunoglobulinas para usarlas como procedimiento de captura en el ELISA. Una fracción de las inmunoglobulinas, se marcó con biotina por un método establecido y, por ELISA, se verificó su actividad de anticuerpo. Se probaron diferentes concentraciones de inmunoglobulina de captura y de anticuerpo marcado, así como dos diluciones de suero y tres soluciones de sustrato. Finalmente, el ELISA de captura de antígenos consistió en: anticuerpo de captura a 25 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo biotinilado a 25 $\mu\text{g/ml}$, dilución de suero 1:3, avidina peroxidasa 1:500 y cromógeno disuelto en una solución de fosfato de sodio dibásico y ácido cítrico 0.1 M pH 5. Con estas condiciones, en la curva de calibración, la mínima cantidad de antígeno que se detectó fue de 0.001 $\mu\text{g/ml}$, utilizando inmunoglobulina anti-PES y de 0.01 $\mu\text{g/ml}$ empleando anti-ESA (figura 19).

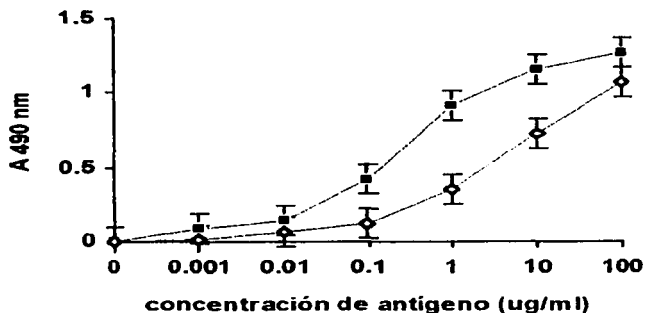
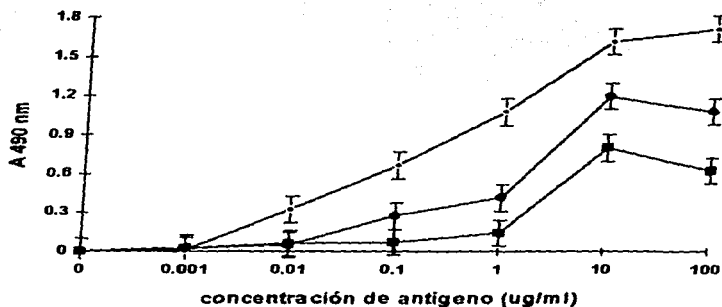


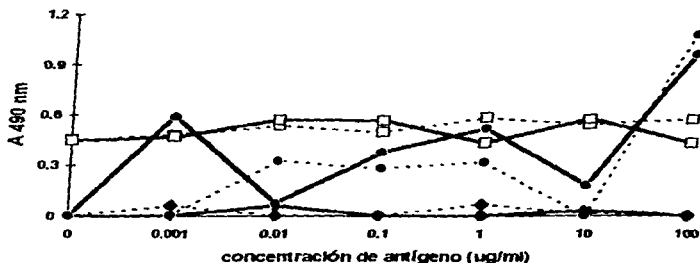
Figura 19. Curvas de calibración para la captura de antígenos circulantes de *Trichinella spiralis*. Para realizar las curvas de calibración para la captura de antígenos se emplearon inmunoglobulinas anti-productos de excreción secreción (■) o anti-extracto soluble antigénico (▼). Los anticuerpos de captura y biotinilados se utilizaron a 25 $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones del antígeno se prepararon en suero de rata no infectada diluido 1:3.

Todos los sueros que se obtuvieron durante el curso de la infección se emplearon para detectar antigenemia, utilizando tanto las inmunoglobulinas anti-PES como las anti-ESA, pero no se detectaron antígenos en ningún momento a pesar de que se detectaron anticuerpos específicos desde los 14 dpi (figuras 13 a 15) y de que al final del experimento se recuperaron las larvas infectivas por digestión artificial del músculo esquelético de cada rata.

Una alternativa para explicar porque no se detectó antigenemia, era suponer que los antígenos se encontraban formando complejos inmunes; para abordar esta posibilidad, se construyeron curvas de calibración, diluyendo los PES en una mezcla de sueros de rata con anticuerpos específicos contra la larva infectiva de *T. spiralis*. La figura 20 a, muestra que la presencia de anticuerpos bloquea la detección de antígenos. Para romper los "posibles complejos-inmunes" formados, se agregó suficiente glicina 100 mM -HCl pH 2.5 ó HCl 10 mM pH 2 ó HCl 1 mM pH 3 a la mezcla de sueros y antígeno para aminorar el pH de la muestra a 4; enseguida, para restaurar el pH fisiológico de la muestra, se agregó suficiente amortiguador de tris aminometano/hidroclorido 5 mM pH 7. La figura 20 b muestra que las curvas de calibración tratadas con glicina ó con HCl, pierden su condición de curva tipo dosis-respuesta.



a



b

Figura 20. Comparación entre las curvas de calibración para la captura de antígenos circulantes de *Trichinella spiralis* empleando suero de rata normal y suero de rata con anticuerpos específicos. En la figura a) se comparan los valores de absorbanza de tres curvas de calibración que se construyeron con antígeno diluido en una solución amortiguadora de tris aminometano/tris hidrocloreto 50 mM pH 7 (▲), en suero de rata normal (●) ó en un suero de rata con anticuerpos α -*Trichinella spiralis* (■). En b) se comparan los valores de absorbanza de las curvas de calibración, en las que se diluyó el antígeno en una mezcla de sueros de rata normales (líneas punteadas) o en sueros de rata con anticuerpos α -*Trichinella spiralis* (líneas continuas). Las muestras se trataron con glicina 100 mM -HCl (□), con HCl 10 mM pH2 (●) ó con HCl 1 mM pH 3 (◆).

5. 4. 4 Detección de la carga parasitaria

No hubo mortalidad en los grupos infectados con 3,000 ó con 5,000 L₁, aunque la rata testigo negativo del grupo infectado con 3,000 L₁ falleció a los 35 dpi. Dentro del grupo infectado con 7,000 L₁, la mortalidad fue del 57%; los animales fallecieron durante las primeras dos semanas *post* infección. Quizá la mortalidad se debió a la conjunción de la carga parasitaria con la manipulación de los animales, ya que, por un lado, durante este periodo las larvas recién nacidas se encuentran migrando por el torrente sanguíneo y por otro, la toma de sangre se realizó por punción cardiaca. La rata que sirvió como testigo negativo del grupo infectado con 7,000 L₁ fue dictaminada como triquinoscopia positiva (220 L₁/g), además, se calculó mediante la digestión artificial de un gramo del músculo del intercostado izquierdo y de un gramo de diafragma que presentaba una carga parasitaria de 451 L₁/g en el primero y 2,500 L₁/g en el segundo. Estos datos podrían apoyar la transmisión del helminto por infección a través de larvas/adultos liberados en heces, aunque no se podría descartar la infección de la rata testigo negativo por la regurgitación de larvas de otra rata del mismo grupo. No se observó canibalismo ni necrofagia.

No se observó diferencia entre el peso corporal de la rata testigo negativo del grupo infectado con 5,000 L₁ (231 g) y el promedio del peso de las ratas de los grupos experimentales: 227±35 g; 222±56 g y 229±39 g. Tampoco se observó diferencia en la longitud de pata izquierda delantera a pata derecha delantera (16, 15±1.4, 15±0.8 y 16±0 cm), ni en la longitud de la punta de la nariz a la punta de la cola (23, 23±0.8, 23±1.4, 24±0.6 cm).

El promedio de larvas encontradas por gramo de músculo en el intercostado fue de 919±786 para el grupo infectado con 3,000 L₁; 1174±1012 para el grupo infectado con 5,000 L₁ y 1204±1132 para el grupo infectado con 7,000 L₁. Por digestión artificial de un gramo de diafragma, se encontraron en promedio 4,623±3375; 5,186±4031 y 3,817±5394 L₁/g, respectivamente. Mediante la triquinoscopia de un gramo de diafragma se encontraron 960±150, 971±512 y 907±315 L₁/g (figura 21).

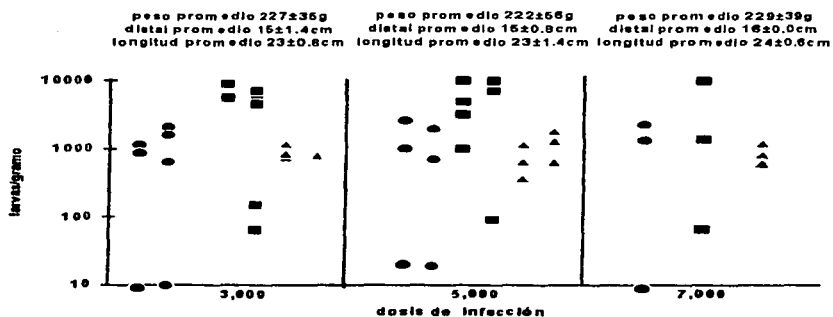


Figura 21. Comparación entre el número de larvas infectivas recuperadas mediante el diagnóstico etiológico. Se compara el número de larvas infectivas recuperadas por la digestión artificial de un gramo de músculo del intercostado izquierdo (círculo) o por la digestión de un gramo de diafragma (cuadro) con el número de larvas infectivas observadas mediante la triquinoscopia de un gramo de diafragma (triángulo). Cada punto representa el número de larvas recuperadas y/u observadas por gramo de tejido de un animal infectado. En la figura, se comparan por grupo de dosis de infección, los promedios del peso corporal (peso promedio), la distancia entre la pata delantera izquierda y la pata delantera derecha (distal promedio), la longitud de la punta de la nariz a la punta de la cola (longitud promedio).

Con el fin de asociar la carga parasitaria con las absorbancias del ELISA para la detección de anticuerpos, se hicieron regresiones lineales entre la densidad óptica de la detección de anticuerpos IgM o IgG anti-ESA y anti-PES. Se confrontó cada sistema de manera individualizada por grupo de infección. Se analizó cuidadosamente el periodo comprendido entre los 35 y 49 dpi, ya que en este, la larva infectiva se encuentra instalada en el músculo esquelético, empleando el dato de la carga parasitaria calculada por digestión artificial ó por triquinoscopia. El trabajo estadístico se realizó, utilizando una base de datos analizada con el paquete epidemiológico de cómputo EPI-INFO (CDC, Atlanta).

No se observó correlación entre las absorbancias de los ensayos inmunoenzimáticos y la dosis de infección, ni entre las absorbancias y la carga parasitaria. La figura 22 muestra la aparición de anticuerpos a los 35 dpi en función de la dosis de infección; las figuras 23 y 24 muestran la detección de anticuerpos a los 49 dpi en función de la carga parasitaria recuperada de la digestión artificial de un gramo del músculo del intercostado izquierdo o de un gramo de diafragma, respectivamente.

También se trató de correlacionar el número de bandas antigénicas del ESA y de los PES reconocidas por IET con la dosis de infección o la carga parasitaria en el músculo del intercostado o en el diafragma; las figuras 25, 26 y 27 mostraron que ni el número de larvas administradas ni la carga parasitaria influyen en el número de bandas reconocidas.

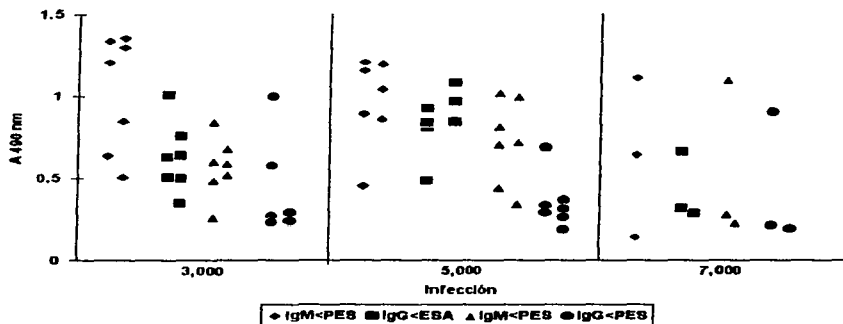


Figura 22. Relación entre la absorbancia del ELISA para la detección de anticuerpos al día 35 *post* infección y la dosis de la infección. El ELISA para la detección de anticuerpos se realizó de acuerdo al método descrito en la sección de "Materiales y Métodos" empleando como antígeno el extracto soluble antigénico (ESA) o los productos de excreción y secreción (PES) de la larva infectiva y un conjugado anti-IgM (aM) o uno anti-IgG (aG) de rata. Cada punto representa la absorbancia del suero de una rata.

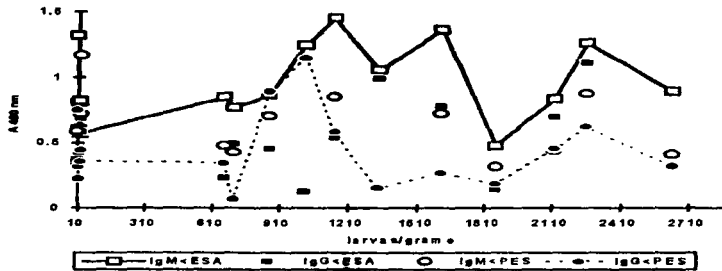


Figura 23. Relación entre la absorbancia del ELISA para la detección de anticuerpos al día 49 post infección y el número de larvas infectivas recuperadas en la digestión artificial de un gramo de músculo del intercostado izquierdo. El ELISA para la detección de anticuerpos se realizó de acuerdo al método descrito en la sección de "Materiales y Métodos" empleando como antígeno el extracto soluble antigénico (ESA) o los productos de excreción y secreción (PES) de la larva infectiva y se detectaron IgM e IgG. Cada punto representa la absorbancia del suero de una rata. Coeficientes de Correlación de: $IgM \alpha ESA = 0.271$; $IgG \alpha ESA = 0.532$; $IgM \alpha PES = -0.099$; $IgG \alpha PES = -0.039$.

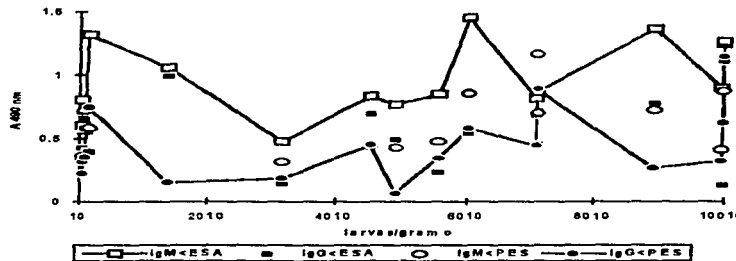


Figura 24. Relación entre la absorbancia del ELISA para la detección de anticuerpos al día 49 post infección y el número de larvas infectivas recuperadas en la digestión artificial de un gramo de diafragma. El ELISA para la detección de anticuerpos se realizó de acuerdo al método descrito en la sección de "Materiales y Métodos" empleando como antígeno el extracto soluble antigénico (ESA) o los productos de excreción y secreción (PES) de la larva infectiva y se detectaron IgM e IgG. Cada punto representa la absorbancia del suero de una rata. Coeficientes de Correlación de: $IgM \alpha ESA = 0.215$; $IgM \alpha PES = 0.560$; $IgG \alpha PES = 0.338$.

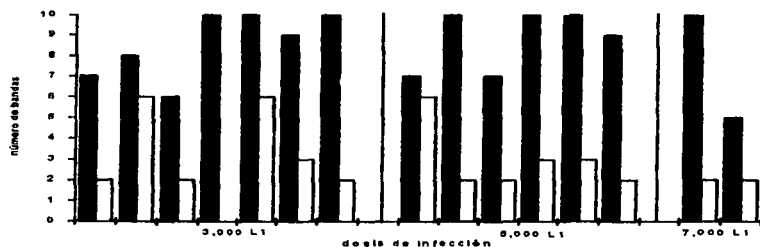


Figura 25. Número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelctrotransferencia en función de la dosis de infección. El número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelctrotransferencia a los 49 días *post* infección en el extracto soluble antigénico (barras cerradas) o en los productos de excreción y secreción (barras abiertas), se asociaron con la dosis de infección. Cada par de barras representa el suero de una rata confrontado con cada antígeno.

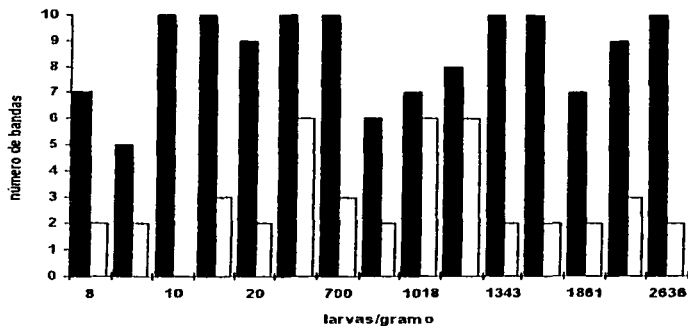


Figura 26. Número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelctrotransferencia en función de la carga parasitaria calculada por la digestión artificial de un gramo de músculo del intercostado izquierdo. El número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelctrotransferencia a los 49 días *post* infección en el extracto soluble antigénico (barras cerradas) o en los productos de excreción y secreción (barras abiertas), se asociaron con la carga parasitaria calculada por la digestión artificial de un gramo de músculo del intercostado izquierdo. Cada par de barras representa el suero de una rata confrontado con cada antígeno. Coeficientes de correlación de: ESA/carga parasitaria= 0.193; PES/carga parasitaria= -0.026.

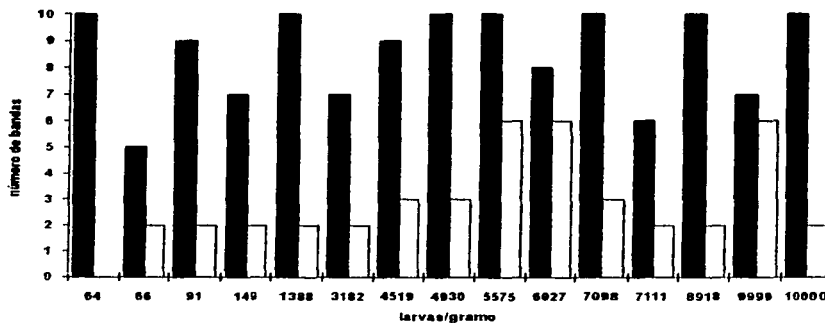


Figura 27. Número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelectrotransferencia en función de la carga parasitaria calculada por la digestión artificial de un gramo de diafragma. El número de bandas antigénicas reconocidas por inmunoelectrotransferencia a los 49 días *post* infección en el extracto soluble antigénico (barras cerradas) o en los productos de excreción y secreción (barras abiertas), se asociaron con la carga parasitaria calculada por la digestión artificial de un gramo de diafragma. Cada par de barras representa el suero de una rata confrontado con cada antígeno. Coeficientes de correlación de. $ESA/carga\ parasitaria = 0.181$; $PES/carga\ parasitaria = 0.476$.

6. DISCUSION

Para realizar el diagnóstico diferencial de la triquinosis se han instrumentado una gran cantidad de técnicas, dentro de ellas, las inmunológicas han sido las más empleadas por ser muy sensibles y versátiles; no obstante, con ellas se han realizado pocos estudios para evaluar la presencia de reacciones cruzadas entre antígenos de *Trichinella* sp. y sueros de pacientes con diferentes enfermedades (Au *et al.*, 1983; Chapa *et al.*, 1992; Morakote *et al.*, 1991; Weiner y Price, 1956). La valoración de la presencia de reacciones cruzadas, es importante porque es una forma de establecer la utilidad de la técnica y de los antígenos empleados en el diagnóstico diferencial. Con el fin de abordar esta problemática, se confrontaron por ELISA e IET, un extracto total de la larva L₁ (ESA) y sueros de pacientes con diferentes enfermedades. Se escogieron sueros de pacientes con enfermedades cuyo cuadro clínico es similar al de triquinosis o con enfermedades comunes de México; adicionalmente, se utilizaron sueros de pacientes con oncocercosis porque ambas parasitosis son producidas por nemátodos tisulares y la presencia de epítomos compartidos no podía ser descartada.

Por ELISA, diluyendo la muestra de suero 1:2,000 e incubándola 2 h con el antígeno, se observó que sólo el suero de un paciente con oncocercosis (figura 5) reaccionó con el ESA; estas observaciones son parecidas a las reportadas por Chapa y colaboradores (1992), quienes no observaron reacciones cruzadas entre un extracto de la larva infectiva y muestras de suero de pacientes con infecciones intestinales causadas por otros helmintos y protozoarios, diluidas 1:320 e incubadas durante 30 minutos. En otros estudios se ha observado desde un 9 hasta un 21% de reacciones cruzadas en muestras de suero de pacientes con ascariosis, cisticercosis, enterobiosis, strongiloidosis, taeniosis, tricocefalosis y uncinariosis, diluidas 1:100 e incubadas durante 30 minutos (Au *et al.*, 1983; Morakote *et al.*, 1991).

En el área de diagnóstico de triquinosis porcina, también se han valorado las reacciones cruzadas entre los sueros de cerdos infectados con otros helmintos y antígenos de *Trichinella spiralis*. Se ha observado que los sueros de dos cerdos infectados naturalmente, uno con *Ascaris suum* y otro con *Trichiuris suis*, reaccionaron con el antígeno de la larva L₁ (Arriaga *et al.*, 1989). En Noruega se evidenció que al menos uno de nueve cerdos no infectados, reconoce el antígeno de *Trichinella* por ELISA (Ruitenbergh y van Knapen, 1977).

Actualmente se ha propuesto que el uso de los productos de excreción y secreción de la larva infectiva en los inmunoensayos disminuye las reacciones falsas positivas en el inmunodiagnóstico de triquinosis porcina; sin embargo, su uso puede verse restringido en el sentido de que, los anticuerpos sólo se detectan, si la carga parasitaria del diafragma es mayor a 1 larva por 10 gramos de peso (Gamble *et al.*, 1983). También se ha planteado que el uso de antígenos purificados a partir de extractos totales de la larva infectiva favorecen la especificidad del ELISA. Homan y van-Knapen (1992), no detectaron reacciones cruzadas con los sueros de pacientes infectados con diferentes helmintos (*microfilaria*, *Toxocara* sp., *Anisakis* sp., *Taenia* sp. y *Echinococcus* sp.) utilizando un antígeno purificado, no obstante, la sensibilidad del ensayo decreció con respecto a la sensibilidad que se obtenía con el extracto crudo.

También se ha propuesto que el uso de proteínas recombinantes podría asegurar la calidad y homogeneidad del antígeno; sin embargo, la sensibilidad y la especificidad de los ensayos que se han instrumentado con estas moléculas, es menor con respecto a las de los ensayos que emplean extractos totales, por la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína de fusión o por la falta de epítomos en la proteína recombinante (Yépez, 1994a; 1995; Zarlenga y Gamble, 1990). Recientemente se ha propuesto que el inmunodiagnóstico de la triquinosis podría mejorarse (incrementando la sensibilidad y especificidad) utilizando antígenos TsL-1, los cuales comparten un epítomo del carbohidrato tivelosa, el cual ha sido identificado como un epítomo inmunodominante de *Trichinella* (Wisnewski *et al.*, 1996).

En el trabajo que aquí se discute, los sueros de las personas sanas y los de los pacientes con brucelosis, cisticercosis, entamebiosis, fiebre tifoidea, tricocéfalosis y toxoplasmosis y los positivos a la prueba de reacción febril, no reaccionaron con el ESA por IET. Los sueros de los pacientes con ascariosis reaccionaron con el antígeno de manera homogénea, pero no con las bandas que reconocen los sueros de los pacientes con triquinosis; de manera particular, un suero de este grupo (figura 6, primer carril del grupo "As") reaccionó intensamente con algunas bandas (69, 74 y 92 kDa). Los sueros de los pacientes con oncocercosis reaccionaron débil y heterogéneamente con bandas de entre 70 y 100 kDa, pero no con las bandas que reconocen los sueros de los pacientes con triquinosis.

El suero ELISA-positivo reaccionó con un antígeno de 77 kDa; a este suero se le determinaron anticuerpos anti-metacéstodo de *Taenia solium* (Antonio Meza¹, comunicación personal). El suero se colectó en una zona endémica de cisticercosis y oncocercosis en Guatemala, aunque solamente se diagnosticó para oncocercosis (Ricardo Lujan², comunicación personal).

Los datos de IET que aquí se discuten concuerdan con los reportados por Alcántara y Correa (1993), Arriaga *et al.* (1989) y Chapa *et al.* (1992), en el sentido de que los sueros de los pacientes con triquinelosis, reaccionaron de manera homogénea con el extracto total de la larva infectiva, reconociendo preferencialmente ocho bandas antigénicas (38, 45, 54, 59, 73, 77, 94 y 104 kDa). Sin embargo, estas observaciones difieren de los datos de otros autores, en el sentido de que en este trabajo no se observó reactividad cruzada con los sueros de pacientes con cisticercosis: recientemente Denegri *et al.* (1995), observaron que los sueros de los pacientes con cisticercosis y adicionalmente los de pacientes con hidatidosis, distomatosis y larva *migrans* reaccionaron con un extracto salino de la larva infectiva; en ese trabajo, los autores proponen que los antígenos de 47 y 52 kDa son de utilidad para el diagnóstico diferencial de la triquinelosis.

Con base en la ausencia virtual de reactividad cruzada, entre los sueros de los pacientes con diferentes enfermedades y el antígeno de *Trichinella spiralis*, se planteó un estudio epidemiológico de corte transversal en una zona suburbana del estado de San Luis Potosí, para ellos, el ELISA se empleó como prueba de rutina y la IET como prueba confirmatoria. Durante el estudio se examinaron 954 sueros y se encontraron 18 muestras positivas, con lo que se calculó una prevalencia de anticuerpos del 1.9%. Por IET los 18 sueros positivos reaccionaron con dos o más bandas del ESA; adicionalmente se observó que uno de los 90 "sueros negativos" reconoció una banda de 59 kDa (figura 9, carril 6 de izquierda a derecha del grupo "negativos"). Con estos datos se calculó que la prevalencia de anticuerpos sería del 1.9% considerando que la IET tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 99% con respecto al ELISA (cuadro 6).

¹ QFI. Antonio Meza, Jefe del laboratorio de Desarrollo, Departamento de Biotecnología, INDRE, SS
² Dr. Ricardo Lujan, Director de la Universidad del Valle de Guatemala

Con la finalidad de determinar con precisión la prevalencia de anticuerpos anti-*T. spiralis* en las muestras de Cerritos, se planteó el uso de los PES para evaluar la reactividad de los 18 sueros positivos y de los 90 sueros negativo probados por IET. Por ELISA se observó que sólo 10 de los 18 sueros positivos reaccionaron con el antígeno y ninguno de los sueros negativos, incluyendo al suero que reaccionó con el ESA por IET; con estos datos se estimó que la prevalencia de anticuerpos es del 1% (cuadro 6). Por IET se observó que 15 de los 18 sueros positivos reconocieron principalmente un duplete de 54 y 59 kDa; de los sueros negativos, el suero que reaccionó con el ESA, reaccionó con una banda de 38 kDa (figura 11, carril 6 de izquierda a derecha del grupo "negativos"). Si la reactividad de este suero negativo se considerara como reacción cruzada, la especificidad y la sensibilidad del IET, en comparación al ELISA con ESA, sería del 95% y del 83% respectivamente. Con esta consideración la seroprevalencia se estimaría en 1.6% (cuadro 6).

En conclusión, se observó que en la muestra de sueros provenientes de Cerritos, SLP, existen anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* y que, dependiendo de la combinación del ensayo inmunoenzimático y del antígeno utilizado, la prevalencia puede variar desde 1.0 hasta 1.9%.

De manera general, los resultados de seroprevalencia que aquí se discuten, son similares a los registrados en otros estudios que utilizan métodos inmunológicos pero, difieren de los que se ha obtenido con base en estudios de necropsia humana. Mazzotti y Lozano (1944), observaron que el 2.2% de 1,000 personas residentes de la Ciudad de México reaccionaron con un extracto salino de la larva infectiva mediante el uso de la prueba intracutánea de Bachman. Cabrera (1977), observó que el 2.4% de 800 sueros provenientes del Estado de Chiapas, reaccionaron con un extracto ácido soluble de la larva infectiva, empleando la floculación con bentonita. Estos datos, junto con los que se encontraron con las muestras de Cerritos, podrían hacer suponer que la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trichinella* sp. en la zona Centro-Sur del país es cercana al 2.0%. Sin embargo, estos datos de seroprevalencia, son menores a los hallados en autopsias realizadas en cadáveres provenientes del servicio forense y hospitales de la Ciudad de México, en los cuales se observó que entre el 4.2 y 12% de los cadáveres albergaban larvas infectivas en el diafragma, con un promedio de 10 L₁/g (Martínez-Marañón, 1974; Mazzotti 1944; Mazzotti y Chavira, 1943).

La diferencia entre los datos de seroprevalencia (2%) y los de diagnóstico etiológico (4.2 al 12%) podría explicarse en el sentido de que la sensibilidad del inmunodiagnóstico esta sujeta a la presencia de anticuerpos y a la calidad del antígeno, mientras que la sensibilidad del diagnóstico etiológico se ve favorecida en estudios de necropsia porque la larva infectiva permanece en el lugar donde se ha establecido y cuando se resuelve la parasitosis, la célula nodriza se calcifica, por lo que la "huella de la parasitosis" existe.

Durante el análisis de los factores de riesgo en el estudio de Cerritos, se encontró que el riesgo de contraer la infección es mayor para las *mujeres* y que el *consumo de moronga* se asocia con la presencia de anticuerpos (cuadro 7), lo cual concuerda con otros estudios en los que se ha observado mayor prevalencia de larvas infectivas en los cadáveres femeninos que en los masculinos (Martínez-Marañón, 1974). Una posibilidad para explicar la asociación entre el *género femenino* y la presencia de larvas infectivas puede ser que, en las comunidades rurales, las mujeres preparan los alimentos y continuamente los "prueban" para condimentarlos. El *consumo de moronga* podría tener intervención en la transmisión del helminto porque, es un alimento preparado con sangre, carne e intestino de cerdo. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los participantes del estudio pudieran haber confundido la *moronga* con otros alimentos de apariencia similar como la *longaniza* y el *chorizo*, en los cuales se ha observado la presencia de larvas infectivas (Quiroz y Landeros, 1988) y cuyo consumo se ha asociado con brotes de triquinosis (Sarti *et al.*, 1986).

Contradictorio a lo que se esperaba, el evento *consumo de carne de cerdo*, no se asoció con la presencia de anticuerpos, pese a que el análisis de los factores socioeconómicos de la población mostró que el 90% de la comunidad consume *carne de cerdo* frecuentemente y que de ellos el 50% los crían como sustento familiar (21% permiten que sus cerdos deambulen). Al término del estudio se indagó sobre otros hábitos alimentarios no contemplados y se encontró que el consumo de "rata de campo" (*Rattus* sp.) es común entre la población, lo cual sugiere que la transmisión de *Trichinella* pudiera ser también a través del consumo de la carne de este animal.

En conclusión, en el estudio epidemiológico que se efectuó en Cerritos, se observó que existe una prevalencia de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* del 1.9%, los cuales se asociaron con el *género femenino* y el *consumo de moronga*.

Como un objetivo adicional al estudio del inmunodiagnóstico de triquinosis humana, se analizó una cinética de aparición de anticuerpos en sueros de ratas infectadas experimentalmente para documentar en que momento se pueden detectar anticuerpos y cuales son los primeros antígenos que se reconocen durante el curso de la parasitosis; además, se instrumentó un ensayo inmunoenzimático para la detección de antigenemia en sueros de ratas infectadas experimentalmente. También se trató de averiguar si había alguna relación entre la carga parasitaria recuperada por la digestión artificial del músculo esquelético y la absorbancia obtenida en el ELISA para la detección de anticuerpos.

En principio, por ELISA se detectaron anticuerpos anti-ESA, desde los 14 dpi (figuras 13 a 15), usando un conjugado de conejo anti-IgG o anti-IgM de rata, lo cual, correspondería en el ciclo de vida de *Trichinella*, al establecimiento de las hembras grávidas en la mucosa intestinal y a la liberación de las larvas recién nacidas (entre los 11 y 15 dpi). Por IET, se observó que el reconocimiento antigénico del ESA, puede dividirse de manera general en dos tipos: uno "temprano", que involucra antígenos que son reconocidos desde los 10-14 dpi (38, 45, 54, 63, 66, 94 y 104 kDa) y uno "tardío", que involucra antígenos reconocidos después de los 25 dpi (59, 73 y 77 kDa).

Los antígenos del ESA reconocidos de manera "temprana", podrían corresponder a los antígenos de superficie de la larva infectiva, descritos previamente por otros autores, porque el peso molecular de los antígenos de "reconocimiento temprano" y los de las moléculas de superficie son parecidos: los antígenos de superficie tienen un peso molecular de 105, 90, 55 y 47 kDa (Appleton *et al.*, 1991; Denkers *et al.*, 1990; McLaren *et al.*, 1987; Ortega-Pierres *et al.*, 1984; 1996; Parkhouse *et al.*, 1981). Sin embargo, considerando que el ESA es un extracto total, no puede descartarse la posibilidad de que los antígenos de "reconocimiento temprano" pudieran corresponder a estructuras internas de la larva infectiva, las cuales también son reconocidas desde la segunda semana *post* infección, ya sea por sueros de rata infectadas experimentalmente o por sueros de pacientes con triquinosis (Takahashi *et al.*, 1990a; 1990b).

A diferencia de otros estudios, aquí se encontró una respuesta "tardía" (después de los 20 dpi) hacia algunos antígenos del ESA de la larva infectiva (59, 73 y 77 kDa). El reconocimiento de estos antígenos dentro del curso de la infección coincide con el establecimiento de la LRN en el músculo esquelético (entre los 15 y 20 dpi).

De manera general, la aparición de los anticuerpos anti-ESA, coincide con los resultados de una cinética efectuada en cerdos infectados experimentalmente, en la cual, la respuesta anti- extracto total de la L₁ se detectó desde los 17 dpi y los primeros antígenos que los sueros reconocieron fueron de 45, 48, 53 y 92 kDa (Homan y van-Knapen, 1992); sin embargo, estas observaciones y las que se discuten en este trabajo, difieren de los datos observados en ratones infectados experimentalmente, en los que la aparición de anticuerpos se detectó a los 21 dpi y el primer antígeno que se detectó fue uno de 47 kDa, seguido de 3 más a los 35 dpi: 52, 65 y 72 kDa (Ortega-Pierres *et al.*, 1989). Estas observaciones podrían ser un indicio de que cada especie responde de manera distinta a los estímulos antigénicos presentados por *Trichinella spiralis*.

Utilizando los PES en el ELISA para determinar la reactividad de los sueros de las ratas infectadas experimentalmente, se observó que se pueden detectar anticuerpos desde los 21 dpi (figuras 13 a 15), lo cual, en términos de la ontogenia de *Trichinella* correspondería a la etapa en que las LRN invaden al miocito. Por IET, se observó que desde los 14 dpi, 10% de los sueros reaccionaron con un duplete de 54 y 59 kDa, el cual fue gradualmente reconocido por el 80% de las muestras después de los 34 dpi. Comparando la frecuencia del reconocimiento de las moléculas antigénicas del ESA y de los PES, se observó que los antígenos de "reconocimiento tardío" del ESA (59, 73 y 77 kDa) y el duplete de los PES (54 y 59 kDa), tienen una cinética de aparición similar: antes de los 25 dpi, son reconocidas por el 20% de los sueros y después, por más del 80% (figura 17).

Los datos sobre la antigenicidad de los PES, concuerdan con los de Gamble (1985) y Zarlenga y Gamble (1990), en el sentido de que los autores caracterizaron la existencia de un par de glicoproteínas inmunogénicas (Ts49 y Ts53) en los productos de excreción y secreción de la larva infectiva, mediante el uso de un anticuerpo monoclonal de ratón (7C2C5) y/o mediante el uso de técnicas de biología molecular. Sin embargo, estos datos, no concuerdan con los de Arriaga y colaboradores (1989), quienes observaron que los sueros de cerdos infectados experimentalmente reaccionaron con tres moléculas antigénicas de 52, 67 y 72 kDa que, según los autores, podrían corresponder a moléculas de superficie; esto podría indicar que las preparaciones antigénicas que se utilizaron en estos estudios son diferentes.

En cuanto al estudio del diagnóstico de la antigenemia en el modelo experimental, se instrumentó un ensayo inmunológico para detectar antígenos circulantes de la larva infectiva, con el cual se evaluaron los sueros de las ratas infectadas experimentalmente; sin embargo, no se detectaron antígenos circulantes. Una posibilidad para explicar esta observación, podría ser que los antígenos se encontraran formando complejos inmunes.

Para abordar esta hipótesis, se añadieron cantidades conocidas de antígeno a una mezcla de sueros de rata con anticuerpos específicos anti-*Trichinella* y se observó que las densidades ópticas registradas eran menores que las obtenidas con antígeno diluido en una mezcla de sueros de ratas normales (figura 20 a); esto podría interpretarse como una disminución de antígeno disponible en el suero para ser detectado. Luego, para tratar de romper el *complejo-inmune* que pudo haberse formado entre el antígeno y los anticuerpos de la mezcla de sueros se empleo glicina 100 mM - HCl pH 2.5 o HCl 1 y 10 mM pero, las muestras tratadas perdían su comportamiento de dosis-respuesta (figura 20 b). En experimentos preliminares, posteriores al término de este trabajo, realizados con la finalidad de romper complejos inmunes de manera mecánica sometido a IET los sueros de ratas infectadas experimentalmente y luego confrontados con un suero hiperinmune de conejo contra *Trichinella spiralis*, no se detectaron antígenos de la larva infectiva (De la Rosa *et al.*, datos no publicados).

Los datos sobre la captura de antígenos que aquí se presentan, no concuerdan con lo reportado por otros autores, en el sentido de que en este trabajo no se detectó antigenemia, mientras que otros autores han reportado métodos hasta con un 50% de sensibilidad. Ivanoska y colaboradores (1989) utilizaron un ensayo inmunoradiométrico con anticuerpos monoclonales anti-exoantígenos de 49 y 53 kDa marcados con I^{125} y anticuerpos policlonales de conejo infectados experimentalmente, con el cual detectaron hasta 4 ng/ml de antígenos circulantes en el 47% de los sueros de 62 pacientes con manifestaciones clínicas y en 13% de casos sospechosos.

Según los autores, durante el seguimiento clínico, la detección de antígenos fue posible desde los 21 dpi y hasta los 120 dpi; a pesar de que los autores discuten que no hay un patrón de antigenemia, hubiese sido interesante conocer una cinética del comportamiento de los antígenos por paciente, comparado con los datos obtenidos con la muestra de una persona sin antecedentes clínicos de triquinelosis.

Nishiyama y colaboradores (1992) emplearon anticuerpos policlonales de conejo contra un extracto crudo de la larva infectiva para la captura de antígenos por ELISA en sueros de individuos involucrados en un brote de triquinosis, los cuales habían estado almacenados por diez años. Según los autores, la positividad del ensayo para los casos clínicos fue del 30%, mientras que la detección de anticuerpos fue del 19%. En los casos asintomáticos, la positividad de seroantígenos fue de 21.4% y la detección de anticuerpos del 5%. Interesantemente en ese estudio, no se detectaron anticuerpos en las muestras que mayor concentración de antígeno presentaron (30 ng/ml; n=10). Los autores discuten que la ausencia de anticuerpos podría deberse a que los pacientes se hallaban cursando con triquinosis aguda y los anticuerpos aún no se presentaban. En este trabajo y en otros (Homan y van Knapen, 1992; Takahashi *et al.*, 1990a; 1990b), se ha mostrado que los anticuerpos pueden detectarse desde la segunda semana *post* infección, lo cual contradice lo propuesto por Nishiyama y colaboradores (1992). Adicionalmente se ha observado en sueros almacenados a -20°C más de tres meses, que la densidad óptica del ELISA para la detección de anticuerpos se incrementa, quizá porque las proteínas del suero se aglomeran y "se pegan" inespecíficamente; esto ha sido observado en sueros de porcinos (van der Leek *et al.*, 1992) y en sueros de humanos (De la Rosa *et al.*, datos no publicados³).

Recientemente Arriaga y colaboradores (1995) reportaron un ELISA para la detección de antígenos circulantes en el cual, anticuerpos policlonales de conejo contra componentes de superficie/esticosoma de la L₁ se utilizaron como elemento de captura y anticuerpos monoclonales contra antígenos TsL-1 se utilizaron para revelar el complejo antígeno/anticuerpo.

Con esta técnica se detectó antigenemia en el 54% de porcinos infectados experimentalmente, la cual se observó entre la tercera y cuarta semana *post* infección (spi) y en la 14 spi. Los anticuerpos se detectaron a partir de la 3 spi. En el estudio de campo, la antigenemia se detectó en 56% de los sueros examinados y los anticuerpos en 94% de ellos. La técnica tuvo una sensibilidad del 25% con respecto a la presencia de larvas infectivas.

³Observaciones realizadas en el manejo de sueros provenientes de la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987 para el diagnóstico de triquinosis humana en el INDRE, SS

Además del ELISA, se han utilizado otras técnicas para determinar antigenemia, como la quimioluminiscencia, microfluorescencia y el fluoroinmunoensayo (DELFLIA). Datos preliminares, utilizando DELFLIA en sueros de ratones infectados experimentalmente, indican que la técnica detecta 1 ng/ml de antígeno a los 7 dpi (Ko, 1995). Esta observación podría indicar que los antígenos se encuentran en concentraciones muy bajas en el suero, por lo que no pueden ser detectados por las técnicas actualmente disponibles.

Teóricamente la detección de antígenos circulantes de la larva infectiva no debería ser un problema, porque la célula nodriza se encuentra rodeada de un plexo de vénulas formadas *de novo*, lo que permitiría el paso de sustancias desde y hacia la larva infectiva (Baruch y Despommier, 1991). ¿Cómo explicar la presencia de anticuerpos sin antígenos que estimulen el sistema inmune?, posiblemente la respuesta es que los antígenos liberados no lleguen a la circulación porque son necesarios para mantener la funcionalidad de la célula nodriza (Despommier, 1990; Ko *et al.*, 1994) o quizá los antígenos son rápidamente secuestrados. Si estas posibilidades fueran la respuesta, la siguiente pregunta que se podría formular es ¿cómo se estimulan los linfocitos B para producir anticuerpos anti-*Trichinella*?

Una de las perspectivas que presenta este trabajo será la realización de estudios de inmunolocalización en la vecindad de la célula nodriza para tratar de identificar hasta donde difunden los antígenos excretados/secretados por la larva infectiva.

Finalmente, en este trabajo no se encontró asociación entre la carga parasitaria observada por triquinoscopia o recuperada en la digestión de un gramo de músculo, con la densidad óptica del ELISA para la detección de anticuerpos. Esto podría sugerir que bajo las condiciones en las que se realizó este trabajo, la detección de la respuesta humoral en los sueros de las ratas infectadas experimentalmente, es independiente de la carga parasitaria y de la dosis que se administró (3,000, 5,000 y 7,000 L₁).

7. CONCLUSIONES

No se observaron reacciones cruzadas entre un extracto total de la larva infectiva de *Trichinella spiralis* y los sueros de pacientes con brucelosis, fiebre tifoidea, entamebiosis, toxoplasmosis, cisticercosis, tricocefalosis y los positivos a las pruebas febriles (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi A* y *B*, *Brucella abortus* y rickettsiosis).

Usando IET, los sueros de los pacientes con oncocercosis y ascariosis reaccionaron con el extracto de la larva infectiva, pero no reconocieron el perfil inmunológico que caracteriza la respuesta humoral de los sueros de pacientes con triquinelosis.

En el estudio epidemiológico de Cerritos, SLP, se encontró una prevalencia de anticuerpos del 1.0 al 1.9%, dependiendo de la combinación de antígeno y técnica utilizados.

La presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* en Cerritos, se asoció con el género *femenino* y con el consumo de *moronga*. Esta observación apoya la presencia de triquinelosis endémica en la región.

En ratas infectadas experimentalmente, la detección de anticuerpos por ELISA se logra entre los 10 y 14 dpi empleando un extracto total de la larva infectiva y, entre los 20 y 25 dpi empleando los productos de excreción y secreción.

Durante el curso de la triquinelosis experimental en rata, los primeros antígenos que se reconocen en el extracto total de la larva infectiva (45, 54, 63, 66, 93 y 104 kDa), tienen un peso molecular semejante al que tienen los antígenos de superficie (47, 55, 90 y 105 kDa). Después de los 25 dpi, sueros reconocen en el extracto tres bandas de 59, 73 y 77 kDa.

En los productos de excreción y secreción de la larva infectiva, los sueros del curso de la parasitosis experimental, reconocen a partir de los 25 dpi, un duplete de 54 y 59 kDa.

La cinética de detección de las bandas de 59, 73 y 77 kDa del extracto total de la larva infectiva y la cinética de detección de las bandas de 54 y 59 kDa de los productos de excreción y secreción, son similares.

No se detectó antigenemia con el ensayo inmunoenzimático que se empleó, en los sueros de las ratas infectadas experimentalmente.

8. REFERENCIAS

- ALCANTARA I. 1995. Prevalencia de seroantígenos en una población abierta de San Luis Potosí, México. Tesis Biólogo. Fac. Ciencias, UNAM
- ALCANTARA P., CORREA D. 1993. Human humoral immune response against *Trichinella spiralis*. Int. J. Parasitology, 23: 657-660.
- ALCANTARA P., DE LA ROSA J. L., CORREA D. 1992. Triquinosis: una parasitosis fuera de serie. Publicación técnica del INDRÉ-SS número 16. México. 56 pp.
- ALCANTARA P., GORODEZKY C., CORREA D., MARTINEZ M., MAGOS C., OLIVO A. 1989. Diagnosis of human trichinosis by the enzyme linked immunosorbent assay. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 31: 227-230.
- ALMOND M., PARKHOUSE R. M. E., CHAPA R., GARCIA E. 1986. The response of humans to surface and secreted antigens of *Trichinella spiralis*. Trop. Med. Parasit. 37: 381-384.
- ANDREWS R. H., AINSWORTH R., ABERNETHY D. 1994. *Trichinella pseudoespiralis* in humans: description of case and its treatment. Trans Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. 88: 200-203.
- APPLETON J. A., BELL R. G., HOMAN W., VAN KNAPEN F. 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Parasitology Today, 7: 190-192.
- ARRIAGA C., MUÑOZ E., MORILLA A., ORTEGA-PIERRES G. 1989. *Trichinella spiralis*: recognition of a muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp. Parasitol. 69: 363-372.
- ARRIAGA C., YEPEZ L., MORILLA A., ORTEGA-PIERRES G. 1995. Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larval antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. Vet. Parasitol. 58: 319-326.
- AU C., KO C., SIMON W., RIDELL J., WONG T., TEMPLER J. 1983. Study of acute trichinosis in ghurkas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella* larval antigens in diagnosis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 77: 412-415.
- BAGHERI A., UBELAKER J. E., STEWART G. L., WOOD B. 1986. Muscle fiber selectivity of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. J. Parasitol. 72: 277-282.
- BARRIGA O.O. 1977. Reactivity and specificity of *Trichinella spiralis* fractions in cutaneous and serological test. J. Clin. Microbiol. 6: 274-279.
- BARUCH M., DESPOMMIER D. D. 1991. Blood vessels in *Trichinella spiralis* infection: a study using vascular casts. J. Parasitol. 77: 99-102
- BELOSEVIC M., DICK T. A. 1979. *Trichinella spiralis*: Comparison of stages in host intestine with those of an Arctic *Trichinella* sp. Exp. Parasitol. 48: 432-446.
- BELOSEVIC M., DICK T. A. 1980. Chemical attraction in the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 66: 88-93.
- BIAGI F. 1985. Enfermedades parasitarias. 2a ed. La Prensa Médica Mexicana. México, D.F. pp. 376.
- CABRAL S. J., VILLICANA F. H., FRAGOSO U. R., CONTRERAS A. 1989. Triquinosis en Zacatecas: perfil epidemiológico 1978 a 1988. Infectología, 10: 627-636.
- CABRAL S. J., VILLICANA F. H., FRAGOSO U. R., CONTRERAS A. 1990. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el Estado de Zacatecas. Salud Pública, Mex., 32: 575- 582.
- CABRERA T. N. 1977. Encuesta serológica de la triquinosis en el Estado de Chiapas, México, utilizando la floculación con bentonita como prueba. Tesis Biólogo. Facultad de Ciencias, UNAM.
- CAMPBELL W. C. 1983. Historical Introduction EN: *Trichinella* and trichinosis. CAMPBELL W (ed). Plenum Press. New York. pp15-29.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). 1991. *Trichinella spiralis* infection. United States, 1990 MMWR, 40(4): 57-60.
- CHAPA R. 1991. Diagnóstico de triquinosis. En: Zoonosis parasitarias FMVZ, UNAM. pp202-204.

- CHAPA R., SALINAS-TOBON R., AGUILAR D. J., MARTÍNEZ-MARAÑÓN R. 1992. Recognition of *Trichinella spiralis* muscle larvae antigens by sera from human infected with this parasite and its potential use in diagnosis. Rev. Latinoam. Microbiol. 34: 95-99.
- COMPTON S., CELUM C., LEE C., THOMPSON D., SUMI S., FRITSCHÉ T., COOMBS R. 1993. Trichinosis with ventilatory failure and persistent myocarditis. Clin. Inf. Diseases. 16: 500-504.
- CORREA D., ALCANTARA P., SARTI E. Triquinelosis en Chalco (datos no publicados).
- CORREA D., DE LA ROSA J. L. ORTEGA-PIERRES G. Trichinellosis: human epidemiology data in Mexico from 1943 to 1995. Proceedings of the nine internacional conference on trichinellosis. México (en prensa)
- DAME J., MURREL K., WORLEY D., SCHAD G. 1989. *Trichinella spiralis*: genetic evidence for synanthropic subspecies in sylvatic hosts. Exp. Parasitol. 64:195-199
- DENEGRI M., GARCIA A., CONTRERAS M., LORCA M. 1995. Antigenos inmunorelevantes de *Trichinella spiralis*, utilidad diagnostica en la triquinelosis humana. Parasitologia al día. 19: 317
- DENKERS E., WASSON D., KO R. C., HAYES C. 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single immunodominant epitope shared by multiple antigens J. immunol. 144: 3152-3160.
- DESPOMMIER D. D. 1977. Immunity to *Trichinella spiralis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26:68-75.
- DESPOMMIER D. D. 1983. Biology. EN: *Trichinella* and trichinosis. CAMPBELL W. (ed). Plenum press. New York, pp 75-142.
- DESPOMMIER D. D. 1990. *Trichinella spiralis*.: the worm that would be virus Parasitol. Today. 6193-196.
- DESPOMMIER D. D., SYMMANS W. F., DELL R. 1991. Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with *Trichinella spiralis* trichinosis. J. Parasitol. 77: 290-295.
- DICK T., SILVER B. 1980. Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. J. Parasitol. 66: 472-477.
- FRAGOSO R. 1981. Un brote de triquinosis en Villanueva, Zacatecas. Salud Pub. Mex. 23: 25-41.
- GAMBLE H. R. 1984. Application of hybridoma technology to the diagnosis of parasitic diseases. Vet. Parasit. 14: 251-261.
- GAMBLE H. R. 1985. *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. Exp. Parasitol. 59: 398-404
- GAMBLE H. R., ANDERSON W., GRAHAM C., MURREL K. D. 1983. Diagnosis of swiine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. Vet. Parasitol. 13: 349-361
- HERNANDEZ M., RAMOS-MARTINEZ E., CASCO-SANCHEZ E. J., MORALES-GOMEZ J. M. Triquinosis aguda 1992. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chih. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. Gaceta Médica de México. 128:45-50.
- HOMAN W. L., VAN-KNAPEN F. 1992. Identification of diagnostic antigens from *Trichinella spiralis*. Parasitol. Research. 78: 112-119.
- IVANOSKA D., CUPERLOVIC K., GAMBLE H. R., MURRELL K. D. 1989. Comparative efficacy of antigen and antibody detection test for human trichinellosis J. Parasitol. 75:38-41.
- KAPEL C. M. 1995. *Trichinella* in the arctic, subarctic and temperate regions: greenland, the nordic countries, and the blatic states. Second seminar on food-borne parasitic zoonoses: current problems, epidemiology, food safety and control. Abstracts. Tailandia.
- KIM C. W. 1983. Epidemiology II: Geographic distribution and prevalence. EN: *Trichinella* and trichinosis. Campbell W. C. (ed) Plenum Press. New York. pp.445-487.
- KO R. C. 1995. A brief update on diagnosis of trichinellosis. Second seminar on food-borne parasitic zoonoses: current problems, epidemiology, food safety and control. Abstracts. Tailandia.
- KO R. C. FAN L. LEE DL. COMPTON H. 1994. Changes in host muscles induced by excretory secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. Parasitology. 108:195-205.
- KOLATA G. 1985. Testing for trichinosis. Science. 227: 621-624.

- LAMOTHE R., GARCIA L. 1988. Helminthiasis del hombre en México. AGT. México, D.F. pp.74-77.
- LAEMMLI U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- LEE T., BEFUS D. 1989. Effects of rat and human intestinal lamina propria cells on viability and muscle establishment of *Trichinella spiralis* newborn larvae. *J. Parasitol.* 75 (1): 124-428.
- LEIBY A., DUFFY H., MURREL K. D., SCHAD G. 1990. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission in the rat population. *J. parasitol.* 76: 360-365.
- LJUNGSTROM. I., HAMMARSTROM. L. KOCIECKAW., SMITH E. 1988. The secuencial appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 75: 230-236.
- MARTINEZ-MARAÑON R. 1979. Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan México. *Salud Publ. Mex.* 21: 161-165.
- MARTINEZ-MARAÑON R. 1985. ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría ser una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo?. *Salud Pub. Mex.* 27: 40-51.
- MARTINEZ-MARAÑON R., RUIZ F. M. FLORES M. O., GALLARDO H. J., LONGORIA M. A., ROJAS C. F., CORTES C. A., ESCOBAR L. M., DIAZ C. 1979. Triquinosis en Zacatecas, Zac. Estudio Epidemiológico y Clínico. *Prensa Med. Mex.* 11: 278-287.
- MARTINEZ-MARAÑON R., TREJO J., DELGADO-AGUIRRE B. 1974. Frecuencia de la Infección por *Trichinella spiralis* en 1000 diafragmas de cadáveres de la ciudad de México en 1972-1973. *Rev. Inv. Salud Pública* 34: 95-105.
- MARTINEZ-PANTALEON O., VIGUERAS-RENDON A., CARVAJAL-GUTIERREZ M., FLORES-PEREZA A., ABRAHAM-JALIL A. 1986. Triquinosis. *Bol. Med. Hosp. Med. Infant. Mex.* 43: 181-183.
- MAZZOTTI L. 1944. Examen de 400 diafragmas humanos en la ciudad de México para investigar triquinosis. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 5: 157-161.
- MAZZOTTI L., ALCANTAR O. 1954. Incidencia de *Trichinella spiralis* en 900 ratas (*Rattus norvegicus*) en la ciudad de México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 15: 201-202.
- MAZZOTTI L., CHAVIRA C. 1943. Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la ciudad de México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 4: 343-345.
- MAZZOTTI L., LOZANO E. 1944. La prueba intracutánea de Bachman para el diagnóstico de la triquina en 1,000 personas sanas de la ciudad de México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 5: 31-35.
- MAZZOTTI L., NUÑEZ C. 1948. Incidencia de triquina en gatos de la ciudad de México. *Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop.* 9: 51-54.
- MCAULAY J., MICHELSON M., SCHANTZ P. 1991. *Trichinella* infections in travelers. *J. Infect. Diseases.* 164: 1013-1016.
- MCLAREN D. J., ORTEGA-PIERRES G., PARKHOUSE R. M. E. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunocytochemical localization surface and intracellular antigens using monoclonal antibody probes. *Parasitol.* 6:279-284.
- MIKHAIL E. M., MANSOUR N. S., AWADALLA H. N. 1994. Identification of *Trichinella* isolates from naturally infected stray dogs in Egypt. *J. Parasitol.* 80: 151-154.
- MORAKOTE N., KHAMBOONRUANG C., SIRIPRASERT V., SUPHAWITAYANUKUL S., MARCANTACHOTL S., THAMASONTHI W., 1991. The value of the enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinosis. *Trop. Med. Parasitol.* 42: 172-174
- NISHIYAMA T., ARAKI T., MIZUNO N., WADA T., IDE T., YAMAGUCHI T. 1992. Detection of circulating antigens in human trichinellosis *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 292-293.
- OLSEN O. W. 1974. Animal Parasites, Their Life Cycles and Ecology. University Park Press. Baltimore. pp 507-513.
- ORTEGA-PIERRES G., CHAYEN A., CLARK W. T., PARKHOUSE R. M. E. 1984. The ocurrence of antibodies hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitol.* 88: 359-69.

- ORTEGA-PIERRES G., MUÑOZ E., CORAL-VAZQUEZ R., PARKHOUSE R. M. E. 1989. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitol. Reserch. 75: 563-569.
- ORTEGA-PIERRES G., YEPEZ L., HOMAN W., GAMBLE H. R., LIM P. L., TAKAHASHI Y., WASSOM D. L., APPLETON J. A. 1996. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunol. 18: 273-284.
- OWEN D. 1990. Parasites of laboratory animal. The Royal Society of Medicine Services Limited. London.
- PARKHOUSE R. M. E., ORTEGA-PIERRES G. 1984. Stage specific antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitology. 88: 623-627.
- PARKHOUSE R. M. E., PHILIPP M., OGILVIE B. M. 1981. Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. Parasite Immunol. 3: 339-352.
- PAWLOWSKI Z. S. 1983. Clinical Aspects in Man. EN: *Trichinella* and trichinellosis. CAMPBELL W. (ed). Plenum Press. NEW YORK. pp 367.
- POZIO E., LA ROSA G., MURRELL K. D., LICHTENFELS J. R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 78: 654-659.
- POZIO E., LA ROSA G., ROSSI P. 1989a. *Trichinella* reference centre. Parasitol. Today. 5: 169-170.
- POZIO E., LA ROSA G., ROSSI P., FICO R. 1989b. Survival of *Trichinella* muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. J. Parasitology. 75: 472-473.
- QUIROZ H., LANDEROS R. 1988. Valoracion del tiempo de sobrevivencia de larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. Rev. Mex. Parasitol. 1: 22-24.
- REASON J., ELLIS A., APPLETON J. A., WISNEWSKI N., GRIEVE B., MCHILL M., WASSOM L., MORRIS R., DELL A. 1994. Novel tyvelose-containing tri-and-tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. Glycobiology. 4:593-603.
- REINHARD K. J. 1991. Recent contributions to new world archaeoparasitology. Parasitol. Today. 7: 81.
- RUITENBERG E., VAN KNAPEN F. 1977. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as a diagnostic method for *Trichinella spiralis* infection in pigs. Vet. Parasitol. 3: 317-326.
- SALINAS R. 1994. Análisis longitudinal de la respuesta inmune humoral humana hacia antígenos de los tres estadios de *Trichinella spiralis*. Tesis Doctor en Ciencias. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.
- SARTI E., GUTIERREZ O. I., KOOPMAN J. S. 1986. Brote de triquinosis ocurrido en una oficina de gobierno, Mexico, D.F. 1985. Salud Pub. Mex. 28: 41-47.
- SILBERSTEIN D. S. 1983. Antigens. EN: *Trichinella* and trichinosis. CAMPBELL W (ed). Plenum press. New York. pp 309.
- SILBERSTEIN D. S., DESPOMMIER D. D. 1985. Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to purified antigens. Science. pp. 227: 948.
- SNYDER D. E., ZARLENGA D. S., LA ROSA G., POZIO E. 1993. Biochemical, biological and genetic characterization of a sylvatic isolate of *Trichinella*. J. Parasitol. 79: 347-352.
- STEWART G. L., GIANNINI S. H. 1982. *Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Brugia*, *Ancylostoma* and *Trichinella* sp.: A review of intracellular parasites of striated muscle. Exp. Parasitol. 53: 406-447.
- TAKAHASHI Y., MIZUNO N., UNO T., AISAKA A., ARAKI T. 1990a. A spectrum of antibody response with time after *Trichinella* infection in rats. J. Parasitol. 76: 230-239.
- TAKAHASHI Y., UNO T., MIZUNO N., SUZUKI H., SHIMAZU K., ARAKI T. 1990b. *Trichinella spiralis*: the *in situ* localization of muscle larva antigens recognized by humans. Exp. Parasitol. 70: 107-110.

- TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- VAN DER LEEK M. L., DAME J. B., LITTELL R. C. 1992. Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis. J. Parasitol. 78: 822-829
- VELASCO O. 1991. Triquinosis. EN: Zoonosis parasitarias. FMVZ, UNAM. México. pp. 200-201.
- VOLLER A., BIDWELL D. E., HULDT G., ENGVALL E. 1974. A microplate method of enzyme linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull. WHO. 51: 209-218
- WAKELIN D., WILSON M. M. 1980. Immunity to *Trichinella spiralis* in irradiate mice. Int. J. Parasitol. 10: 37-40.
- WEINER L. M., PRICE S. 1956. A study of antigenic relationships between *Trichinella spiralis* and *Salmonella thypi*. J. Immunol. 77: 111-114.
- WISNEWSKI N., ZHAG J., BUNDLE D. R., WASSOM D. L. 1996. Use of a novel synthetic β -tyvelose-galnac neoglycan in serological detection of *Trichinella spiralis* infection. Ninth International Conference on Trichinellosis. México City.
- YEPEZ L., ARIZMENDI N., ORTEGA-PIERRES G. 1994a. Production of *Trichinella spiralis* recombinant peptide useful in diagnosis of swine trichinellosis. Proceedings of the eighth international conference on trichinellosis. CAMPBELL W. POZIO E. BRUSCHI F. (ed). Italia. 395-400.
- YEPEZ L., ARIZMENDI N., ORTEGA-PIERRES G. 1995. Utilidad de péptidos recombinantes y sondas de DNA en el diagnóstico de triquinosis. Avance y Perspectiva. 14: 16-20.
- YEPEZ L., ARRIAGA C., ORTEGA-PIERRES G. 1994b. Detección de anticuerpos contra *Trichinella* en caballos y en animales de zoológico mediante ensayos de ELISA e inmunoelectrotransferencia. XI CONAPAR. Querétaro, México
- YEPEZ L., ORTEGA-PIERRES G. 1995. Trichinellosis EN: Parasitología, fascículo IV. FM, UNAM. México. pp 154-160.
- ZARLENGA D. S., GAMBLE H. R. 1990. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53 kD excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscular larvae. Mol. Bioch. Parasitol. 41: 165-174.
- ZIMMERMANN W. J. 1983. Control II: Surveillance in swine and other animals by muscle examination. EN: *Trichinella* and trichinosis. CAMPBELL WC. (ed). Plenum Press. New York. pp 515-528.

GLOSARIO

A	absorbancia	NaOH	hidróxido de amonio
α-	<i>anti</i> -, haciendo referencia a anticuerpos	°C	grados centígrados
ac's	anticuerpos	PBS	amortiguador de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2
ACF	adyuvante completo de Freund	PBS-tween	amortiguador de fosfatos/salina (PBS) con polioxietilensorbital monolaurato (tween 20) al 0.5%
ag's	antígenos	PES	productos de excreción y secreción obtenidos del cultivo <i>in vitro</i> de la larva infectiva
AIF	adyuvante incompleto de Freund	pH	potencial de Hidrógeno
dpi	días post infección	PM	peso molecular
ELISA	ensayo inmunoenzimático	PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro ó α-toluenosulfonil fluorido, inhibidor de proteasas a serina y proteasas a cisteína
ELISA/ag's	ELISA para la captura de antígenos	RPMI	medio de cultivo para células eucariotas; contiene aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, hepes, glutatión y rojo fenol
ESA	extracto soluble antigénico de la larva infectiva, enriquecido con componentes de superficie y esticosoma	spi	semanas post infección
g	gramos	TLCK	N-α-p-tosil-lisina clorometil cetona, inhibidor competitivo de tripsina y de papaina
h	horas	TPCK	L-1-tosilamida 2 feniletíl clorometil cetona, inhibidor competitivo de quimi tripsina y de papaina
H₂O₂	peróxido de hidrógeno	tris-base	tris hidroximetil aminometano
H₂SO₄	ácido sulfúrico	tween 20	polioxietilensorbital monolaurato
HCl	ácido clorhídrico	U/ml	unidades por mililitro
hpi	horas post infección	xg	gravedades
IET	inmunolectrotransferencia ó Western blot		
IgG	inmunoglobulina de la clase G		
kDa	kilo Dalton		
L₁	larva infectiva de <i>Trichinella</i> , estado que se encuentra encapsulado en una célula nodriza en el músculo del hospedero		
M	molaridad		
mA	miliamperes		
µg	microgramos		
mg	miligramos		
µg/ml	microgramos por mililitro		
MgCl₂·6H₂O	cloruro de magnesio hexahidratado		
min	minutos		
µl	microlitros		
ml	mililitros		
mm	milímetro		
mM	milimolar		
N	normalidad		
NaCl	cloruro de sodio		

CUADROS

Número	contenido	página
01	procedencia de los sueros de pacientes con diferentes enfermedades	19
02	soluciones para preparar el gel inferior de electroforesis	27
03	soluciones para preparar el gel superior de electroforesis	28
04	reactividad de los sueros positivos por IET hacia el ESA	38
05	reactividad de los sueros positivos por IET hacia los PES	42
06	seroprevalencia en Cerritos según técnicas y antígenos usados	43
07	factores de riesgo asociados a la presencia de anticuerpos en ELISA/ESA	48

FIGURAS

Número	contenido	página
01	esquema de la morfología de <i>Trichinella spiralis</i>	5
02	ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	8
03	brotes y casos de triquinosis oficialmente registrados en México	16
04	electroforesis en geles de poliacrilamida del ESA y de los PES de la larva infectiva	30
05	reacciones cruzadas por ELISA, entre el suero de pacientes con diferentes enfermedades y ESA	31
06	reactividad de los sueros de pacientes con oncocercosis y ascariosis por IET	33
07	reactividad de los sueros de pacientes con diferentes enfermedades por IET	34
08	distribución de frecuencia de la absorbancia de los sueros de Cerritos.	35
09	reactividad de los sueros positivos hacia el ESA por IET	37
10	reconocimiento antigénico del ESA en IET por los sueros ELISA positivos	39
11	reactividad de los sueros positivos por IET hacia los PES	41

FIGURAS

Número	contenido	página
12	reconocimiento antigénico de los PES en IET por los sueros ELISA positivos	43
13	cinética de la aparición de anticuerpos en ratas infectadas con 3,000 L ₁	46
14	cinética de la aparición de anticuerpos en ratas infectadas con 5,000 L ₁	48
15	cinética de la aparición de anticuerpos en ratas infectadas con 7,000 L ₁	50
16	reactividad de los sueros de ratas hacia el ESA y los PES por IET	53
17	frecuencia del reconocimiento antigénico de las bandas del ESA y de los PES	54
18	comparación de la cinética de aparición de las bandas de 59, 73 y 77 kDa del ESA y de las de 54 y 59 kDa de los PES	55
19	curva de calibración para la captura de antígenos	56
20	curva de calibración empleando suero de rata con anticuerpos	58
21	carga parasitaria recuperada en función de la dosis de infección	60
22	relación entre la dosis de infección y la detección de anticuerpos a los 35dpi	61

FIGURAS

Número	contenido	página
23	detección de anticuerpos a los 49 dpi en función de la carga parasitaria en el músculo del intercostado	62
24	detección de anticuerpos a los 49 dpi en función de la carga parasitaria en el diafragma	62
25	número de bandas del ESA y los PES detectadas por IET en función de las larvas recuperadas	63
26	número de bandas del ESA y los PES detectadas por IET en función de carga parasitaria en músculo a los 49 dpi	63
27	número de bandas del ESA y los PES detectadas por IET en función de carga parasitaria en diafragma a los 49 dpi	64