



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

**TRICHINELLOSIS HUMANA: ANALISIS
LONGITUDINAL DE LA RESPUESTA DE
ANTICUERPOS IgM E IgG SERICOS DIRIGIDOS
CONTRA EL ESTADIO ADULTO DE *Trichinella
spiralis* Y DE SU UTILIDAD EN EL DIAGNOSTICO
DE LA TRICHINELLOSIS HUMANA**

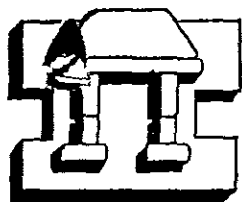
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

ALEJANDRA CONTRERAS RAMOS



IZTACALA

MEXICO

ASESOR: M. en C. MARIA DEL ROSARIO CHAPA RUIZ

283730

2009



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.

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
INMUNOPARASITOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DE
LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO
POLITECNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA M. en C. MARÍA
DEL ROSARIO CHAPA RUIZ

DEDICATORIA

INDICE

	NÚMERO DE PAGINA
A) TABLAS	V
B) FIGURAS	VI
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 TAXONOMÍA DE <i>Trichinella</i>	1
1.2 CICLO DE VIDA DE <i>Trichinella spiralis</i>	3
1.3 MORFOLOGÍA DE <i>Trichinella spiralis</i>	6
1.4 ANTÍGENOS DE <i>Trichinella spiralis</i>	7
1.5 RESPUESTA INMUNITARIA	12
1.6 CUADRO CLÍNICO	15
1.7 ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS	16
1.8 DIAGNÓSTICO	20
1.9 JUSTIFICACIÓN	26
2 OBJETIVO GENERAL	27
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES	27
3 MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1 MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO	28
3.2 OBTENCIÓN DE LA LARVA MUSCULAR	28
3.3 OBTENCIÓN DEL ESTADIO ADULTO DE <i>T. spiralis</i>	28
3.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO SOLUBLE TOTAL DEL ESTADIO ADULTO DE <i>T. spiralis</i>	28
3.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	29
3.6 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO ELISA	30
3.7 ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA INDIRECTO	32
3.8 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SEROLÓGICAS DE INDIVIDUOS CON TRICHINELLOSIS	34
3.9 ANALISIS DE LOS RESULTADOS	34
4 RESULTADOS	36
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO SOLUBLE TOTAL DE ADULTO DE <i>Trichinella spiralis</i>	36
4.2 ESTANDARIZACIÓN	36

4.3 ANÁLISIS DE LOS SUEROS DE INDIVIDUOS APARENTEMENTE SANO Y OTRAS PARASITOSIS	44
4.4 ANÁLISIS DE LOS SUEROS DE BROTE	48
5 DISCUSIÓN	59
6 CONCLUSIONES	62
7 RESUMEN	63
8 BIBLIOGRAFÍA	64

TABLAS

NÚMERO	PÁGINA
1 Características de las especies de <i>TRICHINELLIDAE</i>	2
2 Clasificación de los antígenos Ts	10
3. Antígenos de superficie de <i>Trichinella spiralis</i>	11
4 Respuesta inmunológica de murinos infectados con <i>T spiralis</i>	14
5 Cuantificación de proteínas de <i>T spiralis</i>	29
6 Estandarización del ensayo inmuno enzimático (ELISA)	31
7 Diagrama de flujo	33
8 Condiciones óptimas para los ensayos de ELISA	43
9 Porcentaje de detección de los ensayos a partir de los sueros de individuos aparentemente sanos	55
10 Porcentaje de detección de los ensayos a partir de los sueros de otras parasitosis	56
11 Síntomas y signos de los individuos infectados con trichinellosis	57
12 Parámetros clínicos de los individuos infectados con trichinellosis	58

FIGURAS

NÚMERO	PÁGINA
1 Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	5
2 Distribución geográfica de la trichinellosis humana en el ámbito mundial	18
3 Distribución geográfica de la trichinellosis humana reportada en México 1978-1991	19
4 Titulación del antígeno para la detección de IgM dirigidos contra el EST-Ad de <i>T. spiralis</i>	39
5 Titulación del antígeno para la detección de IgG dirigidos contra el EST-Ad de <i>T. spiralis</i>	39
6 Determinación de la efectividad del agente bloqueador y diluyentes de suero y conjugado para IgM.	40
7 Determinación de la efectividad del agente bloqueador y diluyente del suero y conjugado para IgG.	40
8 Determinación de la efectividad de la combinación de agentes bloqueadores para IgM.	41
9 Titulación del conjugado para IgM.	42
10 Titulación del conjugado para IgG.	42
11 Análisis de la reactividad de los sueros de individuos aparentemente sanos para IgM.	45
12 Análisis de la reactividad de los sueros de individuos aparentemente sanos para IgG	45
13 Análisis de la reactividad de los sueros de individuos infectados con otras parasitosis para IgM.	46
14 Análisis de la reactividad de los sueros de individuos infectados con otras parasitosis para IgG.	46
15 Análisis de la reactividad cruzada de individuos infectados con otras parasitosis para IgM.	47
16 Análisis de la reactividad cruzada de individuos infectados con otras parasitosis para IgG.	47
17 Determinación por ELISA de anticuerpos séricos	

de clase IgM.	51
18 Determinación por ELISA de anticuerpos séricos	
de clase IgG.	52
19 Cinética de la reactividad de los anticuerpos de	
la clase IgM e IgG contra el EST-Ad.	53
20 Análisis longitudinal de la respuestas de anticuerpos	
de la clase IgM e IgG contra el EST-Ad.	54

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis humana es causada por el nemátodo *Trichinella spiralis*. El hombre adquiere la infección al ingerir carne de cerdo mal cocida o cruda y de animales silvestres contaminada con este parásito ⁽⁴⁹⁾.

Trichinella spiralis se encuentra taxonómicamente incluido en la superfamilia *Trichuroidea* que comprende a la familia *Trichinellidae* y ésta a su vez al género *Trichinella*, que consta de ocho grupos denominados (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8) basándose en sus características biológicas, bioquímicas, epidemiológicas, clínicas e inmunológicas. De éstos, cinco corresponden a las especies *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*, *T. nelson* y *T. britovi* (T1 a T4 y T7 respectivamente). A los fenotipos T5, T6 y T8 (aun no se les asigna un nivel taxonómico (tabla 1) ⁽⁴¹⁾.

TABLA I. CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DE *TRICHINELLIDAE*. (4).

GRUPO	ESPECIE (localización)	CARACTERÍSTICAS
T1	<i>T. spiralis</i> (cosmopolita)	Conocida como <i>Sus scrofa</i> Aislada originalmente en forma selvática No resistente al congelamiento Presenta 3 fragmentos de DNA ribosomal de 4.8, 2.2 y 1.8 Kb Alta capacidad de reproducción en ratones, ratas y cerdos
T2	<i>T. nativa</i> (zonas árticas y subárticas de la región holoártica)	Presenta 2 fragmentos de DNA ribosomal de 2.2 y 0.7 Kb Alta resistencia a la congelación Baja capacidad de reproducción en ratas y cerdos
T4	<i>T. pseudoespiralis</i> (cosmopolita)	No desarrolla célula nodriza Infectivo para aves No resistente al congelamiento No presenta fragmentos de DNA ribosomal Muy baja reproducción en cerdos y alta reproducción en ratas
T7	<i>T. nelsoni</i> (África tropical)	Presenta solo un fragmento de DNA ribosomal de 1.8 Kb Baja reproducción en cerdos y ratas No es resistente al congelamiento
T3	<i>T. britovi</i> (zona templada de la región paleártica)	Presenta 2 fragmentos de DNA ribosomal de 2.2 y 1.8 Kb Baja reproducción en ratas y cerdos Baja resistencia al congelamiento.

CLICO DE VIDA

T. spiralis es considerada una especie cosmopolita, tiene la capacidad de infectar a una alta proporción de animales mamíferos en todo el mundo, incluyendo al hombre. Además puede completar su ciclo de vida en un solo hospedero⁽⁴⁹⁾. Este parásito presenta dos ciclos de transmisión; el doméstico y el selvático. En muchas regiones del mundo *T. spiralis*, puede ser transmitido del hábitat selvático al hábitat doméstico por la estrecha relación que existe entre éstos⁽⁴¹⁾.

Pozio y col. (1992), demostraron que el canibalismo dentro de los animales salvajes como: ratas, conejos, lobos, tejones, mapaches y osos, permite la propagación y prevalencia de la infección con *T. spiralis*, aunque también se involucran animales omnívoros. En todos ellos, el parásito permanece viable hasta que muere o son fuente de alimento para los carnívoros incluyendo al hombre. (Citado en Correa y col. 1986)

El ciclo de transmisión doméstico está dado principalmente por el cerdo y el caballo que mantienen una estrecha relación con el sistema selvático. El primero, al alimentarse de carne de rata, ratones o restos de ella y el segundo por la ingestión de pastos contaminados con animales silvestres infectados por el parásito (citado en Correa y col. 1986). La alta relación que mantiene el hombre con los animales domésticos y selváticos ocasiona su infección, al ingerir carne o derivados de éstos, crudos o mal cocidos.

El ciclo de vida ocurre en un solo huésped, en éste el parásito presenta dos fases: la fase enteral y la fase parenteral.

La fase enteral se inicia cuando se ingiere carne que contiene larvas infectivas viables, éstas son liberadas de la célula nodriza en el estómago, por acción de los jugos gástricos. Posteriormente, las larvas pasan al intestino delgado para penetrar varias células columnares intestinales, en ellas se convierten en gusanos adultos. El crecimiento larval está caracterizado por tres fases. Una de crecimiento inicial que comprende 0 a 1 día postinfección, una fase larga de crecimiento hasta de cinco días y una fase de crecimiento exponencial que resulta en un incremento de casi 10 veces el volumen del parásito. Los gusanos adultos son expulsados de su nicho intestinal, por una reacción de hipersensibilidad tipo I. El complejo parásito-hospedero puede permanecer estable durante mucho tiempo⁽²⁶⁾.

La fecundación de las formas adultas hembras se realiza alrededor del tercer día después de la infección y la larviposición se presenta aproximadamente al quinto día postinfección.

La fase parenteral se inicia cuando las larvas recién nacidas (LRN) migran a través de la corriente linfática y sanguínea, para distribuirse en todo el

organismo, hasta alcanzar las células musculares carentes de glucógeno como el diafragma, los músculos de la laringe, la lengua, el abdomen, los espacios intercostales, los bíceps, los pectorales, los gemelos, el deltoides y otros músculos que tienen actividad constante, donde logran penetrar a partir de los 10 días postinfección. Al vigésimo día, la larva alcanza su máximo tamaño y se inicia la encapsulación.

Dentro de la célula muscular, el parásito induce una serie de cambios como engrosamiento y alteraciones del sarcolema, provocando la fragmentación de fibras y acumulación de una membrana capsular interna y una cápsula fibrosa externa infiltrada con capilares sanguíneos que producen una unidad independiente anatómicamente y muy especializada, denominada “ célula nodriza”, aproximadamente al día 20 postinfección. En estas células las larvas se desarrollan hasta transformarse en larvas musculares o infectivas (LM) ^(citado en Alcántara y col., 1996) (Figura 1). En el humano las alrvas enquistadas pueden permanecer viables muchos años, aunque suelen calcificarse en un período de 6 a 9 meses ⁽⁴⁹⁾.

CICLO DE VIDA DE *TRICHINELLA SPIRALIS*

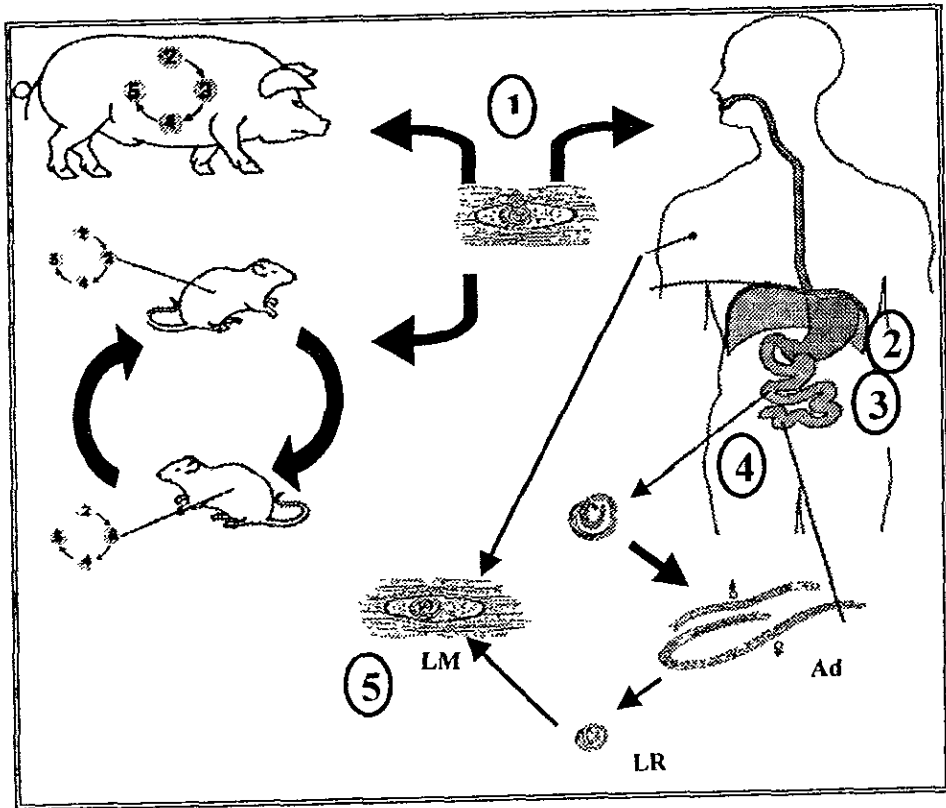


FIGURA 1. Fase enteral y parenteral del ciclo de vida de *trichinella spiralis*. (A) La fase enteral se inicia con la infección del huésped por la ingestión de carne contaminada (por larvas enquistadas en el músculo), de *Trichinella spiralis* (1). Después de exponerse al ácido gástrico y a la pepsina, donde la larva muscular es liberada de la célula nodriza (2), invade la mucosa del intestino grueso y se desarrolla en adulto para reproducirse (3) (la hembra mide 2.2 mm de largo y el macho mide 1.2 mm de largo; la vida de la pareja en el intestino es aproximadamente de cuatro semanas). Una semana después, las hembras liberan larvas (LRN) (4), las cuales migran por el torrente sanguíneo al músculo estriado para enquistarlo y convertirse en Larvas musculares (5) (después de 4 a 5 semanas postinfección).

MORFOLOGÍA

T. spiralis presenta un estadio adulto y cuatro estadios larvarios; los parásitos adultos (Ad) son diminutos y foliiformes; en el extremo anterior presentan una pequeña boca orbicular; papilas cefálicas, un estilete y otras pequeñas estructuras. La parte anterior del cuerpo está ocupada por una glándula denominada esticosoma que rodea al esófago, éste se une en un extremo final con el intestino, el cual está formado por un tubo simple que se extiende hasta la cloaca, la cual se localiza en el extremo terminal. Los machos se pueden diferenciar de las hembras, por sus características ⁽⁴⁷⁾.

El parásito adulto mide 1.2 mm de longitud por 60 µm de diámetro. En el extremo posterior tiene un par de apéndices caudales lobulares. El parásito adulto macho contiene un testículo simple, situado a corta distancia del extremo posterior y se extiende hacia delante aproximadamente a la mitad del cuerpo ⁽²⁾.

Las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud por 60 µm de diámetro, mas de dos veces el tamaño del macho. El extremo posterior es rombo y con curvaturas ventrales, el sistema reproductivo consiste en un ovario único, un receptáculo seminal, un útero, una vagina que forma un canal recto hasta la vulva, situada en la cara ventral del cuerpo. Algunos órganos del tracto reproductor están cubiertos por unas laminas basales, por células epiteliales y por hemolinfa, la cual contiene antígenos de baja especificidad ó TsL-4, asociados a la fosforilcolina. ⁽⁴⁷⁾ El ovario está constituido de una monocapa de epitelio cubierta o por una lamina basal; las células epiteliales de los ovarios tienen un núcleo diminuto y citoplasma muy delgado, y carece de gránulos secretores. La oogonia u ova se forma en una zona germinal del ovario, al madurar ocupa otro sitio dentro del ovario, la oogonia presenta una forma de media luna y nunca superficie lisa. Durante el proceso de maduración; la ova cambia de forma, presentando la formación de prominencias citoplasmáticas de polisomas, un núcleo y el desarrollo de los nucleolos. La superficie exhibe numerosas microvellosidades, las cuales han sido reportadas como antígenos de baja especificidad. Los úteros son de forma circunscrita con intervalos regulares. ⁽⁴⁷⁾

La única fase no intracelular es las larvas recién nacidas, las cuales tienen la forma de una punta lanceolar en su extremidad anterior. Este estadio mide 180 a 120 µm de longitud por 5 ó 6 µm de ancho ⁽⁴¹⁾. El LM posee una cutícula lisa y pseudosegmentada, sin glándulas epidérmicas, con un extremo posterior rodeando y sin apéndices, su aparato digestivo es similar al adulto, rodeado por el esticosoma. Este organelo está constituido por un cordón compacto, de células alineadas, llamadas esticocitos, las cuales contienen diferentes tipos de gránulos. En el extremo anterior del esticosoma se encuentran, de 35 a 40

células, llamadas β -esticocitos y en el extremo posterior de 10 a 15 llamadas α -esticocitos. Takahashi y col.(1991), describieron cinco tipos diferentes de gránulos citoplasmáticos en los esticocitos y los han designado como $\alpha 0$, $\alpha 1$, $\alpha 2$ β y γ .

ANTÍGENOS

Para conocer y entender la relación del parásito-hospedero, así como la inducción de la inmunidad protectora, además del desarrollo de métodos sensibles y específicos para el diagnóstico serológico de la trichinellosis humana y porcina, ha sido necesario, caracterizar y determinar los antígenos que presenta el parásito durante su ciclo de vida.

Se ha comprobado en los inmunodiagnósticos que la mayoría de los nemátodos producen dos diferentes tipos de antígenos: los antígenos de secreción y excreción (ES) que al parecer resultan ser más específicos, y los antígenos somáticos (S). Los productos de ES y S se produce por cada estadio de *T. spiralis*, desarrollando diferente respuesta inmune en una gran variedad de hospederos; entre éstos el ratón, el cerdo, el caballo y el humano. Harwood y col.(1989), descubrieron que los productos de ES de la forma adulta producen una reacción débil, al mezclarlos con el antisuero de cerdo en las pruebas de inmunoblot y en el ensayo inmunoenzimático (ELISA), y además que contienen proteínas de bajo peso molecular. Estudios realizados por Ortega-Pierres (1984) permitieron definir los componentes de superficie de los tres estadios de vida del parásito, al realizar marcaje con radioisótopos. Así, se identificaron por geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), 4 antígenos para la LM de 105, 90, 55 y 47 kDa; 3 componentes para el adulto de 40, 33 y 20 kDa y finalmente 4 moléculas para LRN de 64, 58, 34 y 30 kDa (tabla 2).

La mayoría de los trabajos realizados en cuanto al estudio de los antígenos de *T. spiralis* generalmente se han realizado en el estadio de LM por dos razones principales, la primera, por que se pueden obtener en mayores cantidades y la segunda, por que la LM expone al hospedero una gran cantidad de antígenos provenientes de diferentes compartimentos, entre los que se encuentran los antígenos de cutícula, los antígenos de ES, además de los somáticos⁽⁴⁹⁾.

A este respecto, Takahashi (1991) dividió a los antígenos estructurales de la larva muscular de *T. spiralis* en dos grupos; El grupo de respuesta lenta (SRG) que comprende los antígenos producidos por los esticocitos, los gránulos, el esófago y la superficie cuticular, y el grupo de respuesta rápida (RRG) formado por la cutícula interior, la hipodermis, los gránulos, la hemofilia, los órganos genitales, las sustancias producidas por el intestino medio y las células granulares de las glándulas intestinales.

En cuanto a los antígenos de ES de la larva muscular, Gamble y col. (1983), demostraron que los antígenos obtenidos después de 24 horas en cultivo, son altamente específicos y forman parte importante en la relación parásito-hospedero. Por otra parte Arasu, en 1994, mediante análisis inmunohistoquímicos demostró que los esticocitos alfa, alfa, beta y gama presentan glicoproteínas de peso molecular de 47 y 55 kDa, las cuales forman homodímeros para dar origen a moléculas de 90 y 105 kDa, respectivamente. Estas moléculas previenen la activación del complemento, evitando así las reacciones inflamatorias; y no son reconocidas por sueros de individuos infectados crónicamente con otras parasitosis.

Con la finalidad de estudiar detalladamente los componentes antígenicos de la LM, se han producido anticuerpos monoclonales (mAc), en donde destaca el producido por Ortega-Pierres y col. (1984), denominados (NIM-M1) el cual precipitó a los antígenos de superficie de la LM y reconoció los antígenos de la zona oral del adulto, lo cual tiene posiblemente implicaciones en la inducción de inmunidad; ya que la inmunización con extractos de LM inducen una expulsión acelerada del organismo adulto ⁽⁴⁾.

Diversos anticuerpos monoclonales dirigidos contra LM de *T. spiralis* tienen un patrón de reactividad específica hacia los antígenos de ES y S, los cuales se clasifican dentro del grupo TsL (tabla 2)

Lowry en 1994 demostró por ensayos de transferencia pasiva que al utilizar el mAc NIM-M1 en ratas adultas se produce una rápida expulsión del parásito (tabla 3). Este anticuerpo monoclonal reconoce especialmente glicoproteínas de la superficie/esticosoma presentes en los antígenos TsL-1, los cuales son importantes en el desarrollo de la inmunidad hacia el parásito; Además se ha observado que estos antígenos son estadio específico por que se pierden durante el proceso de muda el cual ocurre durante las primeras 24 horas de la fase enteral de la infección ⁽¹¹⁾. Estudios recientes han demostrado que el epítipo responsable de la inmunodinancia de las glicoproteínas de la superficie esticosomal, radica en un azúcar: la tivelosa (3, 6 didesoxihexosa), la cual es específica del grupo T-1 de *Trichinella* ⁽⁵⁾.

Debido a la semejanza filogenética que presenta *T. spiralis* con otros parásitos, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que han permitido determinar las moléculas y los epítipos responsable de la reactivada cruzada que presentan las preparaciones antigénicas de *T. spiralis*, en el diagnóstico de la parasitosis.

La gp50, liberada en las secreciones de varios estadios del ciclo de vida del parásito *T. spiralis*, y que se producen en las células lineales de las glándulas hipodérmicas, también es reconocida por el suero de pacientes infectados con filarias y con fasciola ⁽⁸⁾. Así mismo Linder y col. (1991), utilizando el mAc

2B11 en las pruebas de inmunofluorescencia y de ELISA, detectaron una glicoproteína de 50 kDa de *T. spiralis* que es también reconocida por los anticuerpos dirigidos contra *Schistosoma masoni*, ésta se produce en el primordio genital por lo que resulta ser importante en la reacción cruzada observada entre los nemátodos y los tremátodos.

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS PERTENECIENTES AL GRUPO T (Tomado por Yepéz-Mulí y Ortega-Piarcos 1994)

ANTÍGENOS IDENTIFICADOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES		
CLASIFICACIÓN	ANTÍGENOS	ANTICUERPOS MONOCLONALES
TsL-1	PSE de LM	9E6
		18H
		305
		Ho-1
		Tsp 103
		NIM-M1
		7C2C5
	extracto de LM	9D4
TsL-2	PSE de LM	6D8
TsL-3	PSE de LM	Ho-5
TsL-4	PSE de LM	6B1
Ts-A1	PSE de Ad	10E8
		1E11-1G8
	extracto de Ad	Ts-2
Ts-L/a/LRN	extracto de LRN	Ho-2

LM, larva muscular, Ad, adulto; LRN, larva recién nacida; PSE, producto de secreción-excreción

TABLA 3. ANTÍGENOS DE SUPERFICIE DE *TRICHINELLA SPIRALIS* ESPECÍFICOS DE ESTADIOS Y SU ESPECIFICIDAD A LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

(Tomado por Ortega 1984)

ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE <i>Trichinella spiralis</i>				
ESTADIO	Peso Molecular (X 10 ³) Antígenos de superficie	Anticuerpos monoclonales Nombre	Especificidad Kd	Reconocimiento de superficie
LM	105, 90, 55, 47	NIM-M1	105, 90, 55, 47	+
		NIM-M2	90, 47	-
Ad	40, 33, 20	NIM-M3	40, 20	+
		NIM-M4	40, 20	-
LRM	64, 58, 34, 30	NIM-M5	64	+
		NIM-M6	64	-

LM. Larva Muscular. Ad. adulto. LRM. Larva recién nacida: +, positivo; -, negativo

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

En términos generales, las investigaciones realizadas en helmintos intestinales muestran que los componentes principales: exclusión inmune, regulación inmune y/o eliminación inmune. La exclusión inmune representa la primera línea de defensa y se refiere a la protección de la superficie de la mucosa por medio de anticuerpos (IgA e IgM de secreción) y otros factores innatos; la regulación inmune es un mecanismo complejo de defensa de segunda línea, involucra la respuesta celular específica, que se lleva a cabo en las placas de Peyer y los tejidos linfoides asociados al intestino. Esta respuesta incluye la diferenciación y la activación de células B y T, así como la interrelación entre subpoblaciones de éstas últimas células. Por otro lado, la eliminación inmune involucra una variedad de reacciones inflamatorias, hipersensibilidad del tipo I o alergias, que son amplificadas y que incrementan las actividades de protección en la capa de la mucosa ⁽¹⁶⁾.

En la trichinellosis, la respuesta inmunitaria humoral y celular específica del hospedero se desarrolla hacia los diversos estadios del ciclo de vida del parásito. Esta se manifiesta a nivel intestinal como una respuesta inflamatoria que causa la expulsión del parásito, y a nivel muscular como la formación del infiltrados celulares conteniendo eosinófilos, polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos, que rodean las células musculares infectadas. Esta respuesta es protectora ya que los animales infectados desarrollan un estado de resistencia a la infección ^(citado en Alcántara y col. 1996).

En la trichinellosis la respuesta inmunológica, desarrollada hacia el estado larval está bien caracterizada en sistemas murinos (Tabla 4), al contrario de lo que sucede en el hombre. En el humano se ha comprobado que los antígenos de respuesta lenta, son detectados o identificados por anticuerpos de la clase IgM, mientras que los antígenos de respuesta rápida son identificados por la clase IgG ⁽⁴⁸⁾. También se ha encontrado que se detectan complejos inmunes a partir del 7º día post-infección, posteriormente incrementan entre los días 14 a 21 post-infección, el cual resulta beneficiosa para el huésped porque facilita la eliminación de antígenos circulantes, pero resulta perjudicial cuando los complejos se depositan en los tejidos ⁽⁵⁰⁾.

Para determinar los isotipos de las inmunoglobulinas desarrolladas durante la trichinellosis humana, Knapen y col. (1982), utilizaron un extracto soluble total de larva muscular en el ELISA, para analizar la respuesta humoral durante 11 semanas después de que inició la infección, encontrando que se detectan altos niveles de anticuerpos de las clases IgM e IgG, las cuales permanecen durante un periodo prolongado, mientras que los anticuerpos IgA presentan niveles muy bajos, durante las primeras 4 y 6 semanas

postinfección debido a que la IgA se produce en el intestino y puede detectarse en la circulación como consecuencia de la estimulación del sistema inmunológico dado por el estadio adulto. Por otra parte los niveles de IgE sólo son detectados en un número limitado de pacientes durante un periodo corto de tiempo.

Sin embargo Salinas y col. (1993), utilizando antígenos de S y Ext de LM, por medio de ELISA, encontraron que los niveles de inmunoglobulinas totales con ambos antígenos son incrementados a partir de la 5ª semana postinfección.

Después de 10 años de infección los anticuerpos IgG totales e IgG4 son detectados en la mayoría de los pacientes sintomáticos y sus niveles no difieren de los presentados por los individuos asintomáticos y aparentemente sanos ⁽²⁴⁾.

TABLA 4. RESPUESTA INMUNE EN RATONES A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DE *TRICHINELLA SPIRALIS* ^(Formado por Wakelme, 1983)

CICLO DE VIDA DEL PARASITO	RESPUESTA DEL HOSPEDERO
-Entrada de larva infectiva	Toma, procesos y reconocimiento
invasión enterocítica	de antígenos
-Producción del antígeno esticosomal	Respuesta de anticuerpos
-Exposición del antígeno de superficie	Respuesta de células cebadas
-Maduración de adultos	Comienza la inflamación intestinal
-Producción de nuevas larvas (LRN)	Respuesta de anticuerpos
-Exposición de antígenos de Ad y LRN	Respuesta de células cebadas
-Expulsión de hembras adultas	Inflamación aguda
-Migración de LM	Respuesta de anticuerpos
-Invasión de músculos	Eosinofilia
-Formación de células nodrizas	Subsiste la inflamación intestinal
-Producción de antígeno de los esticocitos	Inflamación muscular
y formación de cápsulas	

LRN, larva recién nacida; LM, larva muscular; Ad, adulto

CUADRO CLÍNICO

La trichinellosis humana continúa presentándose en muchas partes del mundo. En México, esta parasitosis se presenta como un problema de salud pública. Sin embargo, la frecuencia de la trichinellosis no se conoce en forma precisa. A este respecto se han realizado algunos estudios epidemiológicos, los cuales indican que la principal fuente de infección para el humano es la carne de cerdo contaminada con el parásito ^(15, 11).

El cuadro clínico de la trichinellosis está determinado por las características genéticas, la edad y el estado inmunológico del huésped, además del número de larvas infectivas ingeridas, (la mayoría de las infecciones leves, presentan menos de 10 larvas por gramo de músculo y son consideradas asintomáticas, mientras que las infecciones masivas o sintomáticas, pueden tener más de 50 larvas por gramo de tejido, comprometen la vida del enfermo, así Todos estos factores ocasionan una gran variabilidad de las distintas etapas de la enfermedad ^(citado en Alcántara y Méndez 1996)

En ocasiones, los síntomas y signos clínicos se pueden confundir con las enfermedades causadas por otros agentes parasitarios como la salmonelosis, la brucelosis, la fiebre tifoidea entre otras, por lo que el diagnóstico de esta parasitosis es difícil.

Las alteraciones sanatomopatológicas y la sintomatología de la trichinellosis se dividen entres fases sucesivas caracterizadas por un periodo de incubación, un estado agudo de la enfermedad y un periodo de ^{recuperación (citado en Alcántara y Méndez 1996)}

El periodo de incubación de la trichinellosis tiene una duración de 51 días. Durante los primeros siete días después de la ingestión de la carne infectada, se presentan síntomas gastrointestinales como: diarrea, dolor abdominal, vómito, náuseas y cefalea, debido a ala presencia en el intestino delgado de larvas infectivas y su transformación y maduración a adultos; que corresponden a la primera fase del ciclo de vida del parásito: El periodo de incubación finaliza cuando aparece el síndrome de la trichinellosis (fiebre, mialgia y edema periorbital) ^(citado en Alcántara y Méndez 1996). En el humano, el órgano principalmente involucrado durante este periodo es el intestino.

Durante la fase de invasión muscular, cuando las LRN atraviesan los órganos linfoides, el pulmón, el sistema nervios central, los músculos esqueléticos, así como el corazón se origina una reacción inflamatoria aguda, en donde se presentan fiebre, escalofrío, diaforesis, edema, deshidratación, disneacianosis, vértigo, convulsiones, hiperflexia, eosinofilia, erupciones cutáneas, tos, hemoptisis, bronquitis, mialgias, cefalea, insomnio, irritabilidad, somnolencia, postración así como síntomas oculares como el enrojecimiento, dolor y ardor, también aparecen los síntomas psicológicos como mal humor, baja tolerancia

a la tensión emocional, pérdida de memoria y de concentración. Esta fase se presenta a partir de las primeras 8 semanas postinfección y finaliza con la recuperación de la enfermedad o la muerte del individuo.

En la fase de convalecencia cuando se presenta la encapsulación de la larva infectiva en la célula nodriza, la fiebre desaparece, disminuyen la sintomatología muscular, la somnolencia, la debilidad muscular, la pérdida de peso y las complicaciones como la bronconeumonía, trombosis muscular y encefalitis. La recuperación del hospedero se presenta en pocos meses o un año, pero puede incluso permanecer con los parásitos viables hasta que muere⁽³⁶⁾. Después de 10 años de la infección, los síntomas no específicos decrecen, como son la debilidad del músculo y la fatiga⁽²⁴⁾.

ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS

T. spiralis fue observado por primera vez en 1828 por el médico Inglés Peacock, al realizar necropsia en cadáveres humanos. Tiempo después Richard Owen en 1835 describió estas larvas. Así, en 1844 Von Siebold y Dujardin con base a la morfología del parásito, sugirieron que el parásito antes descrito pertenecía a un estadio larvario. Leuckart y Virchow en 1853, demostraron que al administrar a animales experimentales por vía oral larvas musculares, éstas se transformaban en gusanos adultos y además las formas adultas hembras depositaban larvas que migraban hacia los músculos.

En años recientes, la enfermedad ha cobrado gran importancia debido al hecho de que las fuentes de transmisión en varios países no han sido controladas adecuadamente, por lo que se han reportado brotes de trichinellosis en diversas zonas del mundo⁽⁴²⁾ y algunas han sido consideradas zonas endémicas. En la figura 2, se puede observar la gran distribución geográfica de trichinella spiralis que comprende principalmente países de Europa, entre los que destacan: España, Noruega, Suecia, Irlanda y Gran Bretaña, principalmente; así como los países del oriente como son: China, Tailandia, Vietnam, Camboya y Japón entre otros, y finalmente el continente Americano entre los que destacan los países: de Estados Unidos de Norteamérica, México, Chile, Uruguay y Brasil (algunas costas)⁽⁵⁵⁾.

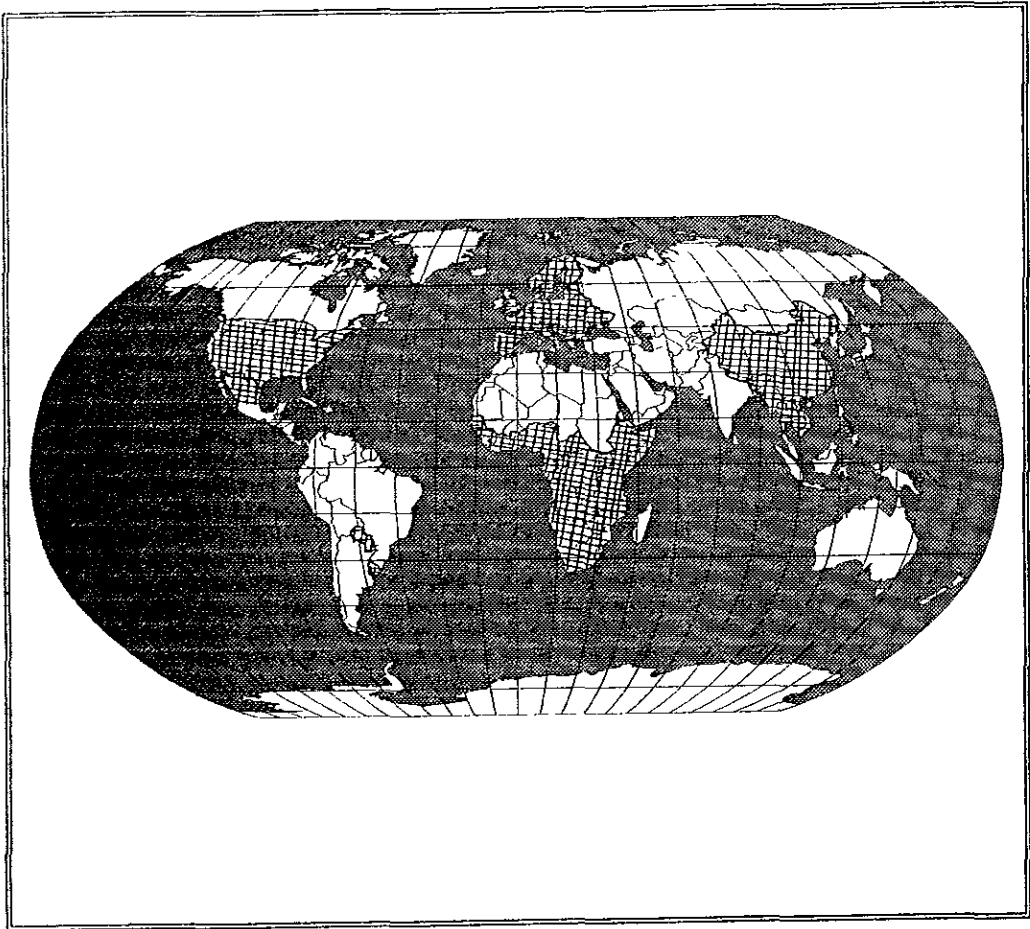
Treinta y nueve años después del descubrimiento del ciclo de vida del parásito se reportaron los primeros casos de trichinellosis en México, sin embargo, la enfermedad no está bien diagnosticada, pero observaciones de varios brotes indican que la frecuencia de la enfermedad está aumentando (Simposium "Trichinellosis Clínica, Recientes Estudios en México", ISET)⁽¹¹⁾.

Al parecer la urbanización de algunas zonas rurales de nuestro país en los últimos años, ha provocado una interrelación antes desconocida entre los

ciclos de animales silvestres y domésticos, aumentando el número y permanencia de cadáveres de animales potencialmente infectados expuestos al consumo de cerdos y perros, teniendo como consecuencia un incremento en la frecuencia e intensidad de la parasitación del cerdo rural, y con ello el aumento del número de casos de infección humana ⁽³⁴⁾.

Los Estados de la República Mexicana que se consideran hasta el momento como endémicos por los brotes de trichinellosis humana reportados oficialmente y no oficialmente son: Chihuahua, Durango, Estado de México, Jalisco y Zacatecas así como el distrito Federal ⁽¹¹⁾.

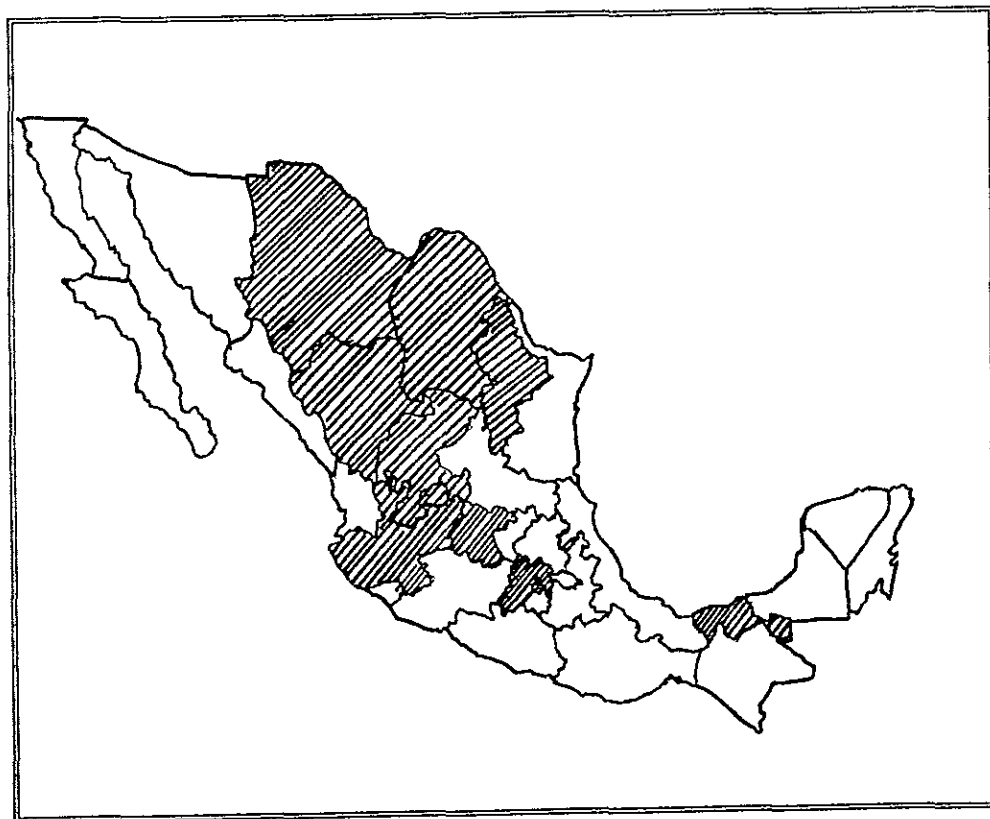
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA TRICHINELLOSIS HUMANA EN EL ÁMBITO MUNDIAL
(Tomado de Yépez-Mután y Ortega-Pierres, 1994)



Trichinella spiralis

FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA TRICHINELLOSIS HUMANA REPORTADA EN MÉXICO DURANTE 1978-1991.

(Tomado de Salina y col; 1991)



 *Trichinella spiralis*

DIAGNÓSTICO

Para efectuar el diagnóstico de la trichinellosis se debe analizar la historia clínica que involucra el tiempo de exposición al parásito, los signos y síntomas presentados por el individuo, la presencia de eosinofilia, las complicaciones clínicas y el tiempo de recuperación, así como evaluar el número de larvas por gramo de tejido muscular que presenta el paciente, analizar los datos epidemiológicos, y realizar estudios paraclínicos. Finalmente aplicar métodos serológicos de diagnóstico ⁽²⁷⁾.

El diagnóstico clínico se fundamenta principalmente en la observación del síndrome general de la trichinellosis (fiebre, mialgia y edema bipalpebral o facial) estos signos y síntomas se presentan en la mayoría de los pacientes con trichinellosis ^(citado en Alcántara y Méndez: 1996).

Se ha observado que el 90% de los casos presentan comúnmente fiebre, sus características son poco constantes en cuanto al tipo, duración y grados de elevación de la temperatura, está generalmente es de tipo remitente ⁽⁴⁰⁾ con exacerbación vespertina ⁽³⁴⁾, pero puede ser continua o intermitente. La mialgia ocurre al mismo tiempo o poco después de que se manifiesta la fiebre, es más frecuente en los casos moderados que en los casos severos y depende de la reacción individual del paciente ⁽⁴⁰⁾. La mialgia de la trichinellosis cuando es intensa, dificulta el movimiento de los músculos involucrados en la locomoción y no es raro que la tos, la risa, la masticación y aún la respiración profunda causen molestias al paciente ⁽³³⁾.

El edema periorbital se debe a una vasculitis alérgica, con dos consecuencias básicas; primero el paso de fluido de los vasos sanguíneos a los espacios intersticiales y segundo la hemorragia. El edema se observa frecuentemente en los casos leves y moderados y desaparece al mismo tiempo que la fiebre.

La presencia de eosinofilia acompañada por el edema bipalpebral y mialgias sugieren fuertemente la infección con *T. spiralis*, sin embargo en la mayoría de los casos leves o severos la eosinofilia está ausente ^(citado en: Alcántara y Méndez 1996).

Durante la trichinellosis se detectan también niveles elevados de leucocitos durante la etapa aguda de la infección, fenómeno asociado posiblemente a la reacción inflamatoria de los músculos ^(citado en Alcántara y Méndez 1996).

Los estudios paraclínicos que deben realizarse son la biometría hemática completa, la velocidad de sedimentación globular y la determinación de las concentraciones séricas de las enzimas musculares como: creatín-fosfoquinasa (CPK), alanino-aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, aldosa y lactato deshidrogenasa (DHL), ya que se ha observado que la concentración de estas enzimas séricas musculares es elevada y ocasionada por el incremento en el

metabolismo o el daño de las fibras musculares, además del aumento de la permeabilidad en las membranas de estas células ⁽⁴⁰⁾.

En la actualidad se han planteado dos tipos de métodos que apoyan el diagnóstico clínico, los directos y los indirectos.

El diagnóstico directo o confirmativo de la trichinellosis se realiza detectando la presencia de la larva muscular enquistada en tejido muscular, y se efectúa por varios métodos como son: la triquinoscopia, el método de digestión artificial, la biopsia muscular y el xenodiagnóstico ^(citado en Chapa y col 1989).

La técnica de la triquinoscopia consiste en el análisis de la presencia de LM en fragmentos de músculo estriado con un triquinoscopio en fragmentos de músculos estriado. El músculo se coloca entre dos porta objetos. Éste es el método de rutina que se utiliza en los rastros federales, para el control de la trichinellosis; sin embargo éste es poco sensible con respecto a la detección de anticuerpos específicos ya que solamente se detecta el 60% de las muestras contaminadas ⁽¹⁵⁾. Esta técnica presenta además otras desventajas, como una baja sensibilidad en el caso de infecciones leves o resultados negativos falsos durante la fase intestinal y circulante del parásito, cuando la larva no está aun presente en el músculo. Por otra parte, ocasiona fatiga ocular a los investigadores ⁽³¹⁾.

Por lo que respecta al humano, se descubrió un brote de la enfermedad en el estado de Chihuahua, en donde se encontraron afectados 166 personas, 59 de las cuales fueron hospitalizadas. A estas últimas personas se les practicó la biopsia muscular, detectando la presencia del parásito mediante la triquinoscopia, así como realizando una innovación de esta técnica por compresión tisular y tinción (TCTT). La sensibilidad obtenida de estas dos técnicas fue de 88.1% y de 90.3% respectivamente, detectando durante este estudio de 1 a 10 larvas musculares en las muestras analizadas, sin embargo la sensibilidad de este ensayo es reducida cuando se trata de muestras más pequeñas ⁽⁵⁵⁾.

El método de digestión artificial, utiliza el principio de la digestión gástrica ya que la digestión del tejido muscular se efectúa en una solución de pepsina-HCl al 1%. De este modo las larvas sobreviven y son recuperadas por sedimentación espontánea. La ventaja de este método es que permite trabajar muestras más grandes hasta de 100 g, permitiendo detectar inclusive las infecciones leves ⁽⁵⁷⁾ y se puede analizar un bajo número de muestras, sin embargo consume un mayor tiempo que la triquinoscopia.

La biopsia muscular se realiza tomando muestras (0.5 a 1 g) preferentemente de los músculos superficiales como son los deltoides, los bíceps, los cuadríceps o gemelos ⁽⁴³⁾. Para el diagnóstico humano, se recomienda analizar los músculos pectorales, bíceps, glúteos, intercostales, etc. Tomando las

muestras después de 21 días de la infección ya que antes de este tiempo el número de larvas no es suficiente para obtener un buen diagnóstico ⁽⁵⁷⁾.

Por medio de este análisis se puede observar el parásito y las alteraciones basofílas del sarcoplasma de las fibras del músculo ⁽³³⁾. Cuando el resultado es negativo se deben realizar varios cortes transversales que corroboren la ausencia del parásito ⁽⁵⁶⁾.

Aunque la biopsia es uno de los métodos prácticos para la demostración directa del parásito, no es posible cuantificar el grado de infección (larvas por gramo), debido a la alta frecuencia de resultados negativos en pacientes infectados y a que la sensibilidad del método está influenciada por el tiempo de infección y por el estado inmunológico del paciente ⁽⁴⁰⁾. Además, presenta complicaciones traumáticas para los pacientes y riesgo de infección en la herida ⁽⁸⁾.

El xenodiagnóstico es una técnica no muy conocida, solo determina la viabilidad de las larvas en una muestra de músculo y consiste en alimentar a ratas o ratones de laboratorio ⁽⁵⁷⁾, con las muestras de carne. Después de una semana se constata la infección de formas adultas del parásito en el intestino agudo por el método de Baerman.

Desde el advenimiento de los métodos inmunoenzimáticos heterólogos, se ha resaltado la conveniencia de su aplicación en el diagnóstico de las enfermedades parasitarias ⁽¹⁰⁾. Los métodos serológicos basados en la detección de anticuerpos específicos que se han desarrollado durante el curso de la trichinelosis humana son: la fijación de complemento, la hemaglutinación (PHA), aglutinación de látex (AL), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la técnica de floculación de betonita (BFT), la inmunoelectroforesis o contraelectroforesis (CIE), el radioinmunoensayo (RIA), el ensayo de inhibición competitiva (CIA), la inmunoelectrotransferencia (Western/blot WB) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). Mientras que para la detección de antígenos del parásito en la circulación se han planteado el ensayo inmunoradiométrico (IRMA), el ensayo de inhibición competitiva (CIA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), ⁽²⁷⁾. Estas técnicas han hecho posible estimar la sensibilidad de las pruebas inmunodiagnósticas para la trichinelosis animal y humana, en términos de mínima infección detectable y precocidad de la detección; así como, expresar la sensibilidad diagnóstica de estos procedimientos en larvas por gramo y tiempo mínimo de detección de la infección ⁽¹⁰⁾.

La efectividad de los métodos serológicos es altamente dependiente de la calidad y especificidad de los antígenos de *T. spiralis* usados, para evitar así las reacciones positivas falsas por el uso de extractos crudos del parásito. Los

antígenos que hasta la fecha son más utilizados son los obtenidos de la larva muscular o infectiva⁽³¹⁾.

La fijación de complemento fue utilizada por vez primera por Strobel en 1911, para la detección de la trichinellosis, sin presentar gran trascendencia. La sensibilidad y la especificidad de este método ha sido del 20%, sin embargo este porcentaje varía mucho entre cada laboratorio⁽²⁸⁾.

La hemaglutinación pasiva fue aplicada en 1956 y fue popular en los Estados Unidos durante el periodo de 1974 a 1975, presentando un porcentaje de efectividad de 82% de los casos estudiados⁽⁶⁾.

Choy y col, (1988) utilizando un anticuerpo monoclonal en la prueba de látex, obtuvieron el 88.6, 76.5 y 60% de sensibilidad en cerdos, en cambio para el hombre la sensibilidad obtenida fue del 20% (Yépez y Ortega, 1994). La detección de la AL se presenta a partir de la 3ª semana de la aparición de la sintomatología y en comparación con el ELISA resulta ser de menor sensibilidad^(citado en Chapa y col., 1989).

La IFI fue descrita por Jackoon en 1959 y no fue hasta 1962 que Sadun la utiliza para la detección de anticuerpos dirigidos contra *T. spiralis*, esta prueba resultó ser altamente sensible y específica para el diagnóstico de la trichinellosis aguada en comparación con BFT de Sulzer (1965), por presentar una limitada reactivada cruzada con otras infecciones parasitarias^(Citado en: Matossian, 1975).

Un estudio realizado por, Jackson en 1959, reveló que el precipitado formado alrededor de los orificios anal y oral de las larvas musculares de *T. spiralis* viables se observaba brillantemente después de la exposición a antisueros marcados con isotiocianato de fluoresceína, por lo que la propuso como método de diagnóstico, pero su estudio y aplicación no fueron profundizados⁽⁵³⁾.

En 1959, Labzoffsky y col (1959) Establecieron que la cutícula de *T. spiralis* reaccionaba con antisueros específicos por IFI. Sadun y col. (1962) describieron un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en que las larvas completas fijadas fueron usadas como antígeno, el cual tuvo una vida media de pocas semanas^(citado en: Wegesa y col., 1971). Por otra parte Ivanoska y col. en 1989, al usar IFI detectaron anticuerpos contra *T. spiralis* en un 100% de los pacientes con signos y síntomas clínicos indicativos de trichinellosis, mientras que en el grupo de individuos carentes de síntomas clínicos obvios, pero con sospecha de haber sido expuestos a la infección con *T. spiralis*, sólo resultó positivo el 46% de los casos.

La BFT descrita por Sulzer en 1960, fue utilizada en 1963 por Norman y Kagan para evaluar su utilidad en el diagnóstico, de la trichinellosis humana llegando a la conclusión de que resulta positiva en los casos agudos. Este

ensayo detecta anticuerpos IgG y muestra un alto nivel de reproducibilidad, además de que el antígeno no presenta reacción cruzada con otras infecciones parasitarias ^(citado en Matossian, 1975)

La CIE descrita por Despommier y col. en 1974, fue aplicada en el análisis de la trichinellosis porcina, utilizando una fracción que contenía tres proteínas antigenicas, de 45, 49 y 53 kDa, obtenida a partir de un extracto soluble total de larvas muscular ⁽³¹⁾. Los resultados de esta técnica son obtenidos en una hora ⁽²³⁾. Este ensayo, utiliza una matriz o soporte que generalmente es agar o agarosa en donde se efectúa la migración del antígeno hacia el ánodo y/o la migración del anticuerpo hacia el cátodo, esto permite alcanzar la zona de equivalencia entre las dos concentraciones durante la electroforesis y así se puede observar la precipitación como líneas visibles, lo que determina la sensibilidad es la capacidad de reacción del antígeno con el anticuerpo.

Despommier y col. (1974), han comprobado que la técnica de CIE es equivalente en cuanto, a que su porcentaje de detección a la BFT y a la prueba de AL ⁽⁵⁾, además se ha demostrado que la combinación de la autoradiografía con esta técnica incrementa la sensibilidad en el diagnóstico de la trichinellosis.

En cuanto a la metodología para la detección de antígenos de *T. spiralis* circulantes los ensayos de CIA aplicados por Ivanoska (1989), lograron detectar al 100% de los pacientes sintomáticos y al 46% de los asintomáticos, sin embargo el tiempo de detección se presenta después de los 60 días postinfección.

Por otra parte un estudio comparativo del valor de diagnóstico del IFI y el IRMA en la trichinellosis humana se ha demostrado que este último resulta ser altamente específico ya que es sensible con una baja cantidad de antígeno (4ng/ml) y utiliza se puede emplear anticuerpos monoclonales, sin embargo tiene una baja capacidad de detección (46% de individuos sintomáticos a los 21 días postinfección), en cambio el IFI detecta hasta el 100% de pacientes sintomáticos desde los 20 días postinfección ⁽²⁷⁾.

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) fue aplicado por vez primera a l diagnóstico de la trichinellosis en 1975 por Ruitenberg. En el mismo año Engvall y Ljungström mostraron la posibilidad de detectar inmunoglobulinas calse específica con este ensayo.

La sensibilidad del ELISA, está sujeta normalmente a la variación debido a la diferencia en la habilidad de unión del antígeno al soporte sólido, la marca de las microplacas ⁽¹²⁾, además de la calidad, cantidad y especificidad del antígeno y del anticuerpo empleado (Mahannop y col., 1992)

En un estudio comparativo, Stumpf y col (1989) examinaron los sueros de 58 pacientes con trichinellosis por diversas técnicas serológicas y encontraron

que el porcentaje de detección de los individuos fue del 20% para la aglutinación de látex y la fijación de complemento, del 90% para la hemaglutinación indirecta y del 98% para la inmunofluorescencia ^(7,53). En cambio, para el ELISA fue del 100% cuando se detectó IgG ⁽⁷⁾. Datos similares reportaron Mahannop y col. (1992) al analizar la presencia de anticuerpos IgG contra el extracto soluble total de larva muscular por ELISA durante los días 57 y 120 postinfección.

En comparación con la IFI que sólo permita detectar los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de cutícula, el ELISA permite medir anticuerpos contra extractos solubles totales que contiene antígenos citoplasmáticos y solubilizados de membranas, así como los antígenos de localización cuticular de la larva muscular ⁽⁵¹⁾.

Actualmente esta técnica es considerada la de mayor impacto ya que es un método muy versátil y sencillo de ejecutar, además de que puede realizar el diagnóstico de varias muestras al mismo tiempo ⁽¹⁵⁾, y es importante para el valor diagnóstico de la trichinellosis, por su alta sensibilidad cuando se detectan anticuerpos de clase IgM e IgA, ya que ambas inmunoglobulinas indican una infección reciente.

Coltorti y col. (1987) demostraron que la técnica de ELISA, empleada como método de diagnóstico temprano en el estadio larval infectivo de *T. spiralis*, permite distinguir la población no infectada de la infectada estableciendo un valor de corte tomando la media más 5 desviaciones estándar, a partir de la tercera semana postinfección. Estos autores mencionan además la simplicidad en cuanto a la preparación del antígeno, la ejecución y la lectura que tiene la técnica, lo que permite ser considerado como un método de detección para el estudio de brotes epidémicos de trichinellosis humana.

Por otra parte, al comparar la utilidad de los antígenos S y ES de larva muscular en el diagnóstico de la trichinellosis humana por medio del ELISA y WB Mahannop (1992), encontró que la sensibilidad del S, es del 100% al igual que la de los antígenos ES con suero de pacientes biopsia confirmada colectados a las semanas 5 a 7 postinfección, pero en términos de especificidad resultó ser ligeramente más bajo (96.8%), que el ES (100%). Aunque el extracto somático presenta dos ventajas, se prepara a bajo costo y se obtiene una buena concentración.

Resumiendo todo lo anteriormente mencionado, el empleo del ensayo de ELISA, utilizando los componentes de superficie S o los productos de ES, obtenidos de LM representa una de las mejores alternativas para el diagnóstico de la infección. Sin embargo la utilización de los demás estadios del parásito podría permitir un diagnóstico alternativo más tempranamente durante el curso de la infección.

JUSTIFICACIÓN

El estudio de las respuestas inmune en las infecciones parasitarias es especialmente interesante debido a dos tipos de hechos, por una parte, a nivel mundial, las infecciones parasitarias tiene gran importancia ya que un individuo de cada tres es portador de parásitos; por la otra, la prolongada sobrevivencia de numerosos parásitos en huéspedes inmunes confiere una importancia especial a los modelos parasitarios para el estudio de numerosos mecanismos inmunológicos, como la adquisición de antígenos del huésped, la respuesta inmunitaria, la variación antigénica, la inmunosupresión, los antígenos circulantes, etc. ⁽²⁵⁾.

La trichinellosis humana esta, presente en muchas partes del mundo, generalmente esta asociada al consumo de carne de cerdo y de animales silvestres. En México, esta parasitosis se presenta como un problema de salud pública, sin embargo la frecuencia de trichinellosis en nuestro país no se conoce todavía ⁽⁴⁵⁾.

Los métodos de diagnóstico, descritos anteriormente se han enfocado casi exclusivamente a la detección de antígenos o anticuerpos contra la larva muscular, que es el estadio del parásito que se desarrolla más tardíamente; debido a que se obtiene más fácilmente en comparación con el estadio adulto y la larva recién nacida. Generalmente, la detección de anticuerpos resulta positiva en la mayoría de los pacientes a partir de la semana 5 postinfección. Por otra parte, en modelos experimentales, el análisis de la respuesta inmunológica efectuada por la técnica de inmunofluorescencia demostró un incremento de células productoras de IgM en la mucosa intestinal, al inicio de la infección, y a partir de la segunda semana se observó un aumento de células productoras de IgG.

Debido a lo anterior, se decidió estandarizar un método de diagnóstico que utilizara antígenos del estadio del parásito que se desarrolla más tempranamente durante la infección como es el estadio adulto, para la detección de anticuerpos de clase IgM e IgG, tratando con esto de mejorar el tiempo de detección de la trichinellosis humana; debido a que los anticuerpos de IgM son los que se desarrollan más temprano durante la infección y los de clase IgG por ser los anticuerpos que se producen en mayor concentración en el suero, durante la respuesta inmunológica. El diagnóstico temprano de esta parasitosis permitiría administrar el tratamiento farmacológico oportunamente, evitando así las manifestaciones patológicas más severas de la enfermedad, de los gastos de hospitalización e incluso la muerte de los pacientes graves.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la respuesta de anticuerpos de las clases IgM e IgG desarrollada hacia los antígenos del estadio adulto de *T. spiralis* en pacientes con trichinellosis a lo largo de un año de infección, así como su especificidad, para determinar su utilidad en el diagnóstico y su asociación con las manifestaciones patológicas y la evolución de la infección.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar las condiciones óptimas del ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos de clase IgM e IgG dirigidos contra el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* (EST-Ad).

2.-Analizar el tiempo de aparición de dichos anticuerpos en muestras serológicas de individuos con trichinellosis obtenidas a diferentes tiempos después de la infección en un período de 3 a 57 semanas.

3 - Determinar la especificidad del ensayo analizando la reactivada de los anticuerpos séricos de la clase IgM e IgG de individuos aparentemente sanos con análisis coproparasitológico negativo y de pacientes con otras parasitosis determinados por análisis coproparasitológico y/o serológico.

4.-Analizar la asociación de la producción de anticuerpos IgM e IgG con los signos, síntomas y la etapa aguda o crónica de la trichinellosis humana.

METODOLOGÍA

1.- Mantenimiento del ciclo de vida de *Trichinella spiralis*

La cepa de *T. spiralis* se ha mantenido en el laboratorio durante varios años a través de fases sucesivas en ratones BALB/c.

2.- Obtención de larvas musculares

Las larvas musculares de *T. spiralis* se obtuvieron por medio de una digestión artificial de músculo de ratón BALB/c infectado con el parásito. La metodología empleada se realizó según lo recomendado por Durham y col. (1984). Para ello se sacrificaron ratones BALB/c infectados con el parásito, se les quitó la piel, las extremidades y las vísceras. El músculo esquelético fue cortado con una picadora, posteriormente fue digerido con una solución de pepsina 1%-HCL durante tres horas a 37°C, en agitación. Las LM fueron obtenidas por sedimentación del digerido en un aparato de Baerman conteniendo solución salina durante 30 min.

3.- Obtención del estadio adulto de *T. spiralis*

Las LM obtenidas fueron lavadas con PBS, y se determinó su número y viabilidad, mezclando una alícuota de volumen conocido de suspensión de parásitos en bactor/agar al 0.2% y se observando 5 muestra de 10 µL al microscopio óptico para determinar el número de parásitos en cada muestra. Finalmente, el promedio del número de parásitos presente en las 5 muestras fue obtenido para calcular el número de larvas musculares por mL de suspensión original. La viabilidad se determinó observando que LM estuviera enrolladas en forma de espiral y que presentaban movilidad. Los parásitos muertos se observan estirados e inmóviles. Finalmente, se infectaron por vía intragástrica ratas de la cepa Wistar de 250 g de peso con 8500 LM/rata, 6 o 7 días después de la infección, las ratas se sacrificaron y se obtuvieron los intestinos delgados, los cuales fueron abiertos longitudinalmente y colocados en el aparato de Baerman conteniendo solución salina, posteriormente se incubaron durante 3 h a 37°C para obtener los parásitos adultos, por sedimentación espontánea.

4.-Obtención de extractó soluble total del Estadio Adulto

Los parásitos adultos obtenidos fueron cosechados y lavados con PBS conteniendo antibióticos (penicilina 100U.I./mL, estreptomycin 100µg/mL y fungizona 200mM). Posteriormente se procedió a la obtención del extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* (EST-Ad), siguiendo el método de Parhouse y col. (1984). El cual consistió en homogeneizar los parásitos

adultos en una solución reguladora de tris-HCl 10 mM a pH 8.13, adicionando inhibidores de proteasas (TPCK, TLCK y PMSF 50, 25 y 174 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente); en ciclos de 1 minuto por 3 min. de reposos en baño de hielo. Este proceso se repitió, 5 veces. Finalmente, se adicionó desoxicolato de sodio al 10% hasta alcanzar una concentración final de 2% y se continuó la homogeneización durante 15 min. más, como se describió anteriormente. El homogeneizado fue centrifugado a 12500g por 30 minutos, a 4°C, se obtuvo el sobrenadante, el cual fue empleado como antígeno (EST-Ad). Este se guardó en alícuotas de 1.5 mL que fueron conservadas en nitrógeno líquido hasta el momento de usarse.

5.- Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la técnica de lowry modificación por Dulley y col. (1975). Para realizar la curva tipo se utilizaron las siguientes concentraciones de albúmina sérica bovina (ASB sigma) 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas y las muestras de AST-Ad se trataron como muestras la tabla 5.

El contenido de cada tubo se mezcló con solución E y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente a cada tubo se adicionó 5 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 5 μL de dodecil sulfato de sodio (SDS). Los tubos fueron agitados e incubados por 30 min., a TA, transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica (D.O.) a 750nm. La concentración de proteínas se calculó por interpolación de la D. O. de la muestra problema en la curva patrón de ABS.

TABLA 5.- CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

TUBO	1	2	3	4	5	6	7
ASB (μl)	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	-
H ₂ O (μl)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	-	-
Muestra (μl)	-	-	-	-	-	-	1.0
sol E (μl)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Solución E conformada por (0.5 mL) de tartato, por (0.5 mL) de sulfato de cobre y por (5.0 mL) de carbonato de sodio

6.- Inmonoensayo enzimatico (ELISA)

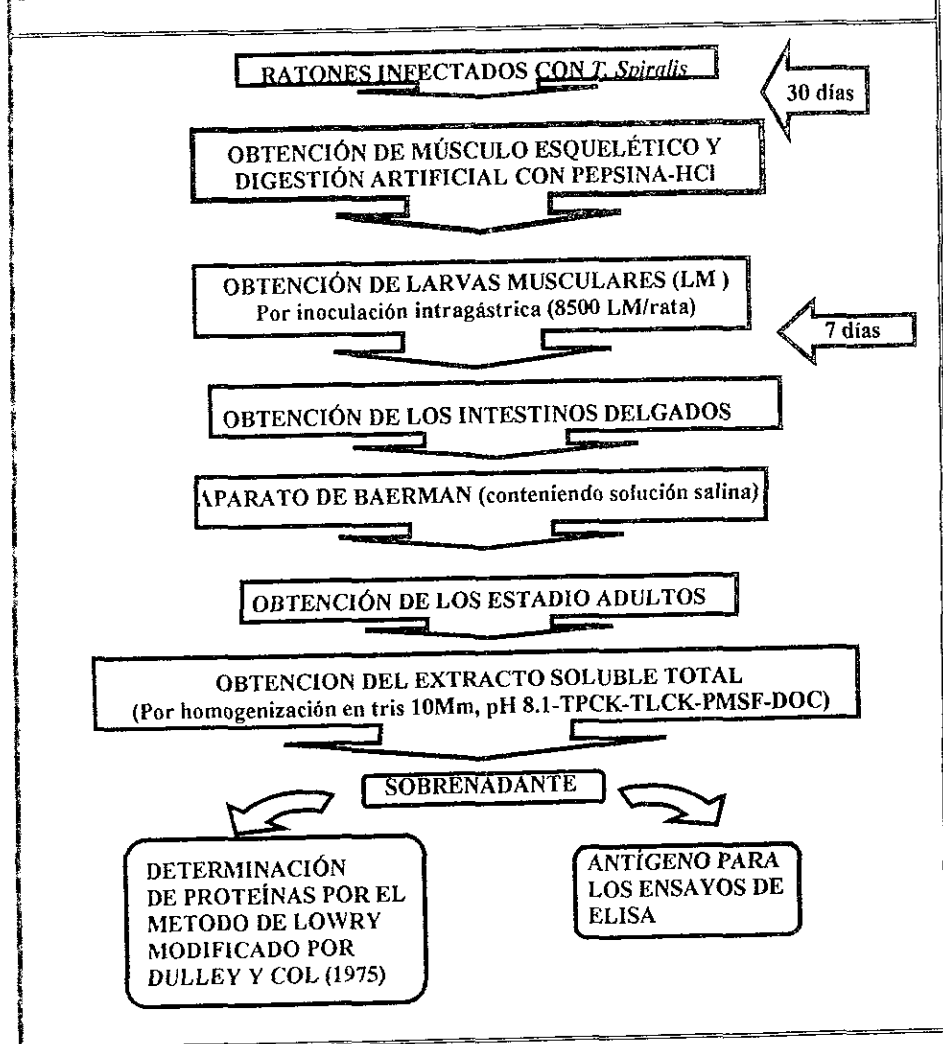
Los ensayos indirectos de ELISA se realizaron de acuerdo al método descrito por Engvall y Voller (1975). Utilizando el EST-Ad como antígeno para la detección de anticuerpos humanos específicos de las clases IgM e IgG, dirigidos contra el estadio adulto de *T. spiralis*. Para ello, a los pozos de poliestireno, por duplicado, se adicionaron 100µL de extracto antigénico disuelto en un regulador de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6 a diferentes concentraciones, o sólo regulador (testigo sin antígeno), incubando a 4°C durante 16 horas.

Transcurrido este período las soluciones empleadas se eliminaron con 4 lavados, de a min cada uno, utilizando una solución reguladora de salina fosfatos adicionada de Tween-20 al 0.1% (PBS-T). Después, se procedió a bloquear los sitios que no fueron ocupados por el antígeno, con 100µL de ASB al 3% en PBS-T (ASB) en todos los pozos, incubando a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron a diferentes diluciones tres tipos de sueros: de individuos sanos (testigo negativo), de individuos con otras parasitosis (testigo positivo) y de pacientes con trichinellosis confirmada por la presencia de LM de *T. spiralis* en la biopsia de tejido muscular, todos en ASB y se incubaron a 37°C.

Enseguida, los pozos fueron lavados con PBS-T, como se describió anteriormente, y se agregó 100µL de la dilución del conjugado de peroxidasa-anti-IgM humana ó anti-IgG humana obtenidas en cabra y se incubó a 37°C durante 24 horas. Después del proceso de lavado, la reacción antígeno-anticuerpos se reveló adicionando una solución de sustrato de la enzima (peróxido de hidrógeno al 0.04% (v/v) y o-fenildiamina, al 40% (p/V) disuelto en regulador de citratos fosfatos 0.2 M a pH 5. Los pozos se incubaron a TA y en la oscuridad durante 60 min. La reacción enzimática fue detenida con la adición de 12 µL de ácido sulfúrico 8 N. Finalmente se determinó la absorbancia a 492 nm en un fotocolorímetro automatizado (lector de ELISA) (tabla 6).

TABLA 6.- DESARROLLO DEL ENSAYO DE ELISA-INDIRECTO

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO SOLUBLE TOTAL DEL ESTADIO ADULTO DE *Trichinella spiralis*



TPCK (N-Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona) TLCK (N-p-tosil-L-lisina clorometil cetona) PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoruro) DOC (Desoxicolato de sodio), HCl (Cloruro de hidrogeno)

6.1.- Estandarización del ELISA Indirecto

la estandarización de este ensayo se efectuó analizando tres proteínas como agentes bloqueadores. ASB 3%, leche 3% y gelatina 0.25% , diferentes concentraciones del antígeno EST.Ad: 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y diferentes diluciones de suero: 1:100, 1: 320, 1:1 000 y 1:3 200 de los sueros testigo positivo y negativo, así como las diluciones del conjugado de peroxidasa-IgG humanas de 1:5 000-1 20 000 y de 1:2 500- 1:10 000, respectivamente (tabla 7).

TABLA 7.- ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS DE ELISA

ESTANDARIZACIÓN DE LOS ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS DE LA CLASE IgM E IgG DIRIGIDOS CONTRA EL ESTADIO ADULTO DE <i>Trichinella spiralis</i>	
ANTÍGENO	2.5, 5 y 10 mg/mL
BLOQUEADOR	ASB al 3%, LECHE al 3% Y GELATINA 0.5%
SUERO HUMANO	1:100, 1:320, 1:1000, 1:3200 Y 1:10000
CONJUGADO	1:2500, 1:5000, 1:1000 Y 1:20000

ASB, Albimina sérica bovina

6.2.- Muestras Serológicas

Las muestras serológicas fueron obtenidos de los siguientes grupos de individuos.

GRUPO 1.- Constituido de 20 sueros de individuos involucrados en un brote de trichinellosis ocurrido en la Cd. de Toluca, Edo de México, en febrero de 1989. El día exacto de la infección se determinó por la participación de estos individuos en una celebración donde ingirieron carne de cerdo mal cocida contaminada con larvas infectivas de *Trichinella spiralis*. La recolección de los sueros se efectuó en las semanas 3, 4, 5, 7, 12, 15, 37, y 57 post-infección. De estos individuos 17 presentaron síntomas clínicos de la enfermedad y el resto fueron asintomáticos. De los 17 pacientes, sólo 13 presentaron larvas musculares de *Trichinella spiralis* en biopsia de músculo bíceps, mientras que los cuatro restantes presentaron dicho diagnóstico parasitológico negativo.

GRUPO 2.- Los sueros testigos negativos se obtuvieron de 25 individuos sanos con análisis coproparasitológico negativo que habitaban en áreas geográficas distintas de la zona en donde ocurrió el brote. Este grupo se incluyó para determinar el valor de corte de los diferentes ensayos de ELISA.

GRUPO 3.- Conformado por 45 sueros para IgG y 35 sueros para IgM, de individuos infectados con otros parásitos tales como *Giardia lamblia*, *Endolimax nana*, *Escherchia coli*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura* y *Cysticercus cellulosae* cuyo diagnóstico fue confirmado por análisis coproparasitológico y/o serológico. Este grupo se analizó para determinar la especificidad del EST-Ad en los diferentes ensayos de ELISA.

7.-Análisis de resultados

Con los datos de las absorbancias (As), obtenidos en los duplicados para cada clase de inmunoglobulina estudiada en los sueros del grupo de individuos aparentemente sanos, se calculó la media y la desviación estándar para determinar al valor de corte de cada ensayo (la media de la absorbancia mas 3 desviaciones estándar). Los valores de As mayores al valor de corte fueron considerados como positivos y los menores como negativos. Debido a que el grupo de sueros de pacientes con otras parasitosis rebasó el valor de corte antes mencionado, y a que en la República Mexicana se presenta una alta incidencia de parasitosis decidimos, utilizar el valor de corte de este otro grupo para determinar los niveles de anticuerpos específicos. Los valores de As mayores al valor de corte obtenido del grupo de individuos con otras parasitosis fueron considerados como positivos.

Así, se obtuvieron los porcentajes de positividad de los individuos con trichinellosis sintomática y asintomática involucrados en el brote, a las diferentes semanas postinfección analizadas

RESULTADOS

La concentración de proteínas presentes en el EST-Ad, fue determinada por el método de Lowry modificado (por Dulley, 1975) y fue de 1.377 mg/mL.

Estandarización de los ensayos de ELISA

En el caso de la titulación del antígeno en el ensayo de ELISA para detectar anticuerpos de clase IgM, se probaron las concentraciones de antígeno (EST-Ad) de 2.5, 5.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ y se observó que la reactividad del suero testigo positivo al utilizar 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno fue baja en comparación con la obtenida empleando las concentraciones de 5.0 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno, con estas concentraciones se obtuvieron valores de absorbancia similares.

La reactividad del suero testigo negativo hacia el EST-Ad, fue baja en comparación con la obtenida en el suero positivo, la reactividad del suero negativo empleando las tres concentraciones de antígeno antes mencionada decreció conforme estas aumentaron. Al obtener la diferencia de absorbancia entre los pozos con antígeno y sin éste, los valores reales de absorbancia obtenidos con las concentraciones de 5.0 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$ del EST-Ad fueron similares, por lo que se consideró que la concentración de 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno fue la óptima (figura 4).

En la titulación de antígeno para la detección de anticuerpos de la clase IgG dirigidos contra el EST-Ad por ELISA (figura 5), se observó que la reactividad del suero testigo positivo fue muy elevada ($A_s > 3.0$) a las diluciones 1:100 - 1:1000, y a diluciones mayores los valores de absorbancia disminuyeron. Estos resultados fueron similares para las tres concentraciones de antígeno analizadas (2.5, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$). En los pozos sin antígeno, éste mismo suero presentó una baja reactividad (A_s de 0.7 ó menores). En este ensayo la reactividad del suero testigo negativo presentó una baja absorbancia con las tres concentraciones de antígeno y sin éste. Dado que la absorbancia del suero testigo positivo obtenida con las tres concentraciones de antígeno fue similar, se tomó a la concentración de 5.0 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno como la óptima para el ensayo por ser la concentración intermedia de las tres analizadas.

Una vez determinada la concentración óptima de antígeno, se analizó la utilidad de la albúmina sérica bovina al 3%, a la leche descremada (svelty) al 3% y la gelatina al 0.25% como agentes bloqueadores y diluyentes de los sueros y del conjugado (figura 6). En estos ensayos se observó que las absorbancias de los sueros testigo positivo obtenidas en la detección de los anticuerpos séricos de la clase IgM fue menor al utilizar la gelatina 0.25% (panel C) en comparación con la ASB y la leche. Con la ASB (panel A) y la leche (panel B) se logró observar una diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas en el suero testigo

positivo en los pozos sin antígeno y los pozos con éste. En cambio, la reactividad del suero testigo negativo obtenida en los pozos con antígeno y sin antígeno al emplear los tres agentes bloqueadores fue significativamente menor que la detectada con los sueros testigo positivo; fue similar con los tres agentes bloqueadores analizados (figura 6). En esta misma figura se puede observar que al comparar las absorbancias obtenidas con la ASB y la leche se encontró que la reactividad del suero testigo positivo a la dilución 1:320 obtenida en los pozos con antígeno fue muy alta con la ASB, lo cual no ocurrió con la leche.

Debido a lo anterior se analizó la combinación de ASB como bloqueador y leche como diluyente del suero y del conjugado. En la figura 8 se muestran los resultados de este análisis, los cuales revelan que la utilización de la ASB como bloqueador y la leche como diluyente del suero y del conjugado (panel A) permiten tener una mayor diferencia en la absorbancia entre el suero testigo positivo y negativo. En cambio al utilizar la leche como bloqueador y la ASB como diluyente del suero y conjugado (panel B), la reactividad del suero positivo varía en ambas diluciones hasta dar valores menores que el suero negativo. Por lo tanto en los análisis subsecuentes se utilizó a la ASB como agente bloqueador y la leche como diluyente del suero y conjugado.

Los resultados del análisis de la ASB, leche, y gelatina como agentes bloqueadores y diluyentes del suero y conjugado, en la detección de anticuerpos IgG contra el EST-Ad (figura 7) demuestran que la ASB y la gelatina permiten observar una diferencia notable de la absorbancia obtenida en los pozos con antígeno, entre los sueros testigo positivo y negativo, así como una baja reactividad de ambos sueros en los pozos sin antígeno. La utilización de la leche como bloqueador y diluyente de los sueros permite observar un incremento en los valores de D. O. en el suero positivo y negativo, por lo tanto una mayor inespecificidad. Los valores de D. O. son similares tanto en el suero positivo como en el negativo, empleando ASB ó gelatina, y debido a una mayor disponibilidad de gelatina, se decidió emplearla en el trabajo.

Establecidas las concentraciones óptimas del antígeno, el agente bloqueador y el diluyente del suero y del conjugado idóneos en cada ensayo, se realizó la titulación del suero y del conjugado de peroxidasa-anti-IgM ó IgG humanas obtenidas en cabra (tabla 8).

En la titulación del conjugado de peroxidasa-anti-IgM humana (figura 9) se observó que en las tres diluciones analizadas (1: 5000, 1:10 000 y 1:20 000) del suero testigo positivo se presentó una reactividad prácticamente similar, la cual fue mayor que la detectada en el suero testigo negativo. Al calcular el valor real se observó que éste era mayor en la dilución 1:20 000 en comparación con las diluciones 1:5000 y 1:10 000 del conjugado, así mismo el testigo del conjugado

a esa dilución presentó la menor reactividad, por lo tanto se considero como la dilución optima del conjugado para el ensayo.

En el análisis de la concentración optima del conjugado peroxidaza-anti-IgG humana se observó que el suero testigo positivo presentó una alta reactividad hacia el EST-Ad en comparación con el suero testigo negativo, con las tres diluciones del conjugado analizadas (1:2500, 1:5000 y 1:10 000). Los valores de absorbancia del suero positivo obtenidos en los pozos sin antígeno fueron ligeramente mayores que los presentados por el suero negativo. Sin embargo, la absorbancia real del suero testigo positivo permanecía aun muy elevada y fueron mayores para la dilución 1:5000 del conjugado en comparación con la dilución 1:10 000. Los testigos del conjugado presentaron valores de absorbancia insignificantes. Basándose en estos resultados se considero que la dilución optima del conjugado era de 1:5000 (figura 10).

Basándose en todo lo anterior, la tabla 8 resume las condiciones óptimas para la determinación de anticuerpos séricos de las clases IgM e IgG dirigidos contra el EST-Ad para la técnica de ELISA.

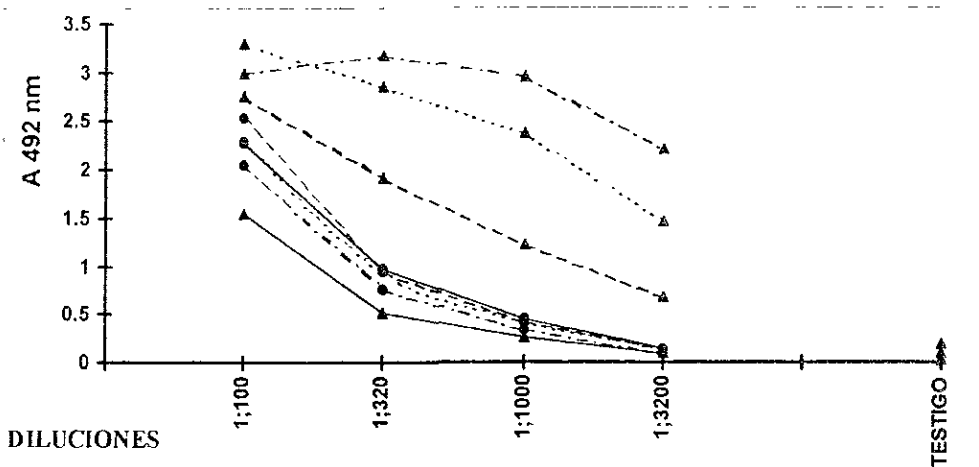


Figura 4 Titulación del antígeno para la detección de IgM dirigida hacia el estadio adulto de *T. spiralis*, en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizó el antígeno a las concentraciones de 0 (—), 2.5 (---), 5 (- - -) y 10 (-·-·) µg/mL, los sueros testigo positivo (●) y negativo (▲) a las diluciones 1:100-1:3200, el conjugado de peroxidasa-anti-IgM humana obtenida en cabra a la dilución 1:10 000, utilizando LECHE al 3% como diluyente y bloqueador.

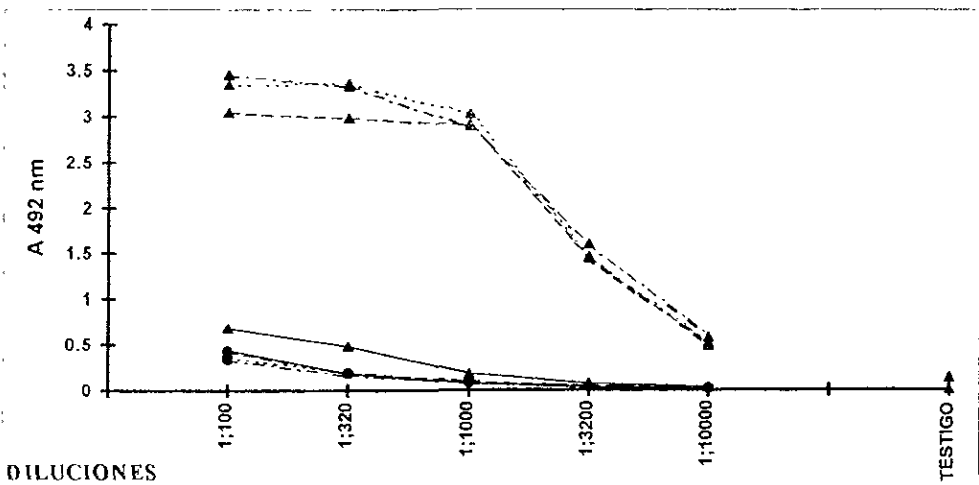


Figura 5. Titulación del antígeno para la detección de IgG dirigida hacia el estadio adulto de *T. spiralis* en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizó el antígeno a las concentraciones de 0 (—), 2.5 (---), 5 (- - -) y 10 (-·-·) µg/mL, los sueros testigo positivo (▲) y negativo (●) a las diluciones 1:100-1:3200, el conjugado de peroxidasa-ant-IgG humana obtenida en cabra a la dilución 1: 5000 y utilizando como diluyente en ambos la ASB al 3%

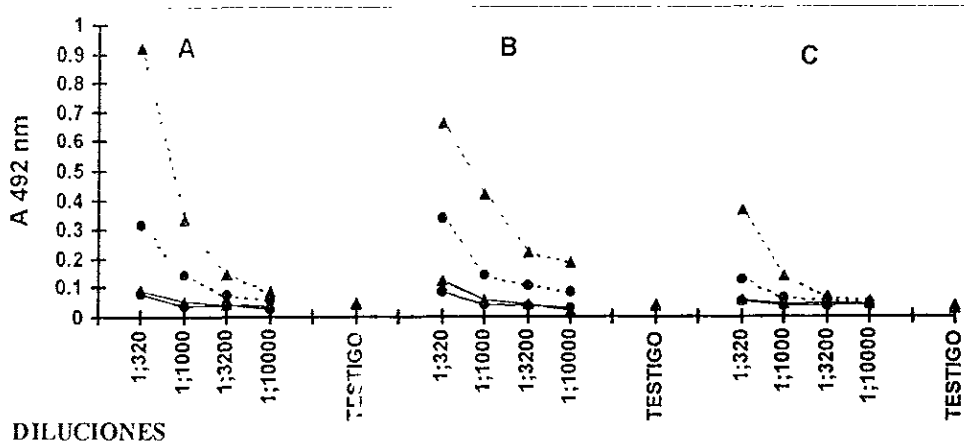


Figura 6 Determinación de la efectividad del agente bloqueador para la detección de IgM dirigida hacia el estadio adulto de *T. spiralis* en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizaron como diluyentes y agentes bloqueadores: albúmina sérica bovina al 3% (A), leche al 3% (B) y gelatina al 0.25% (C); el antígeno fue empleado a las concentraciones de 0 (—) y 5 (---) µg/mL, los sueros testigo positivo (▲) y negativo (●) a las diluciones 1:320-1:10000 y el conjugado de peroxidasa-anti-IgM humana obtenida en cabra a la dilución 1:10000

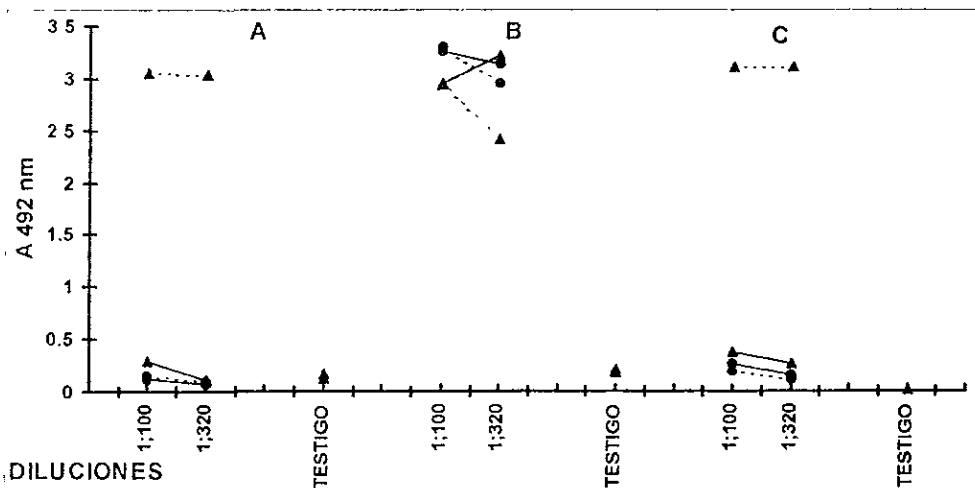


Figura 7. Determinación de la efectividad del agente bloqueador para la detección de IgG dirigida contra el estadio adulto de *T. spiralis*, en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizaron como diluyentes y agentes bloqueadores a las proteínas: albúmina sérica bovina al 3% (A), leche al 3% (B) y gelatina al 0.25% (C), el antígeno fue empleado a las concentraciones de 0 (—) y 5 (---) µg/mL, los sueros testigo positivo (▲) y negativo (●) a las diluciones 1:100-1:320 y el conjugado de peroxidasa-anti-IgG humana obtenida en cabra a la dilución 1:5000.

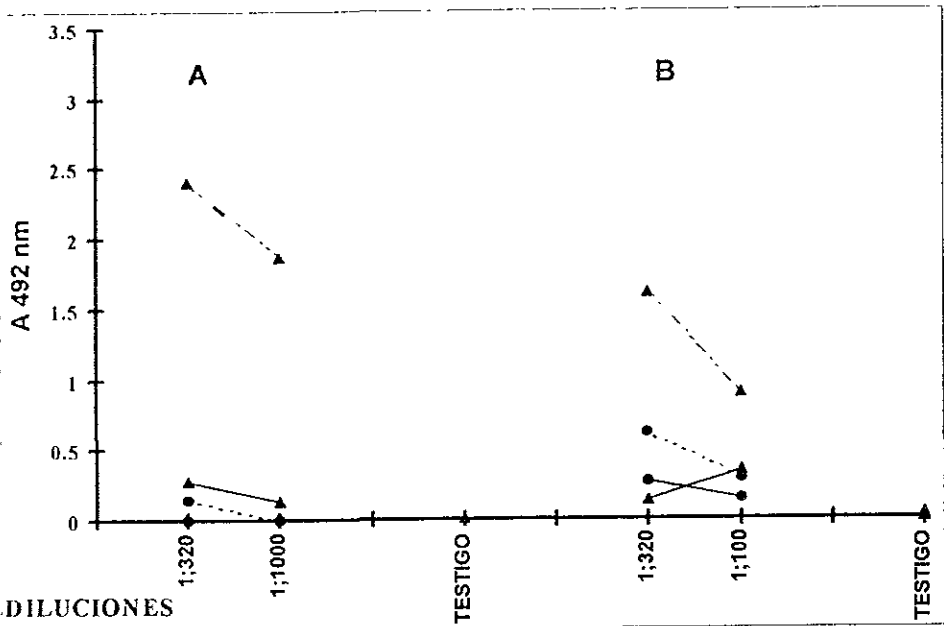


Figura 8. Determinación de los agentes bloqueadores para la detección de IgM dirigida contra el estadio adulto de *T. spiralis* en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizó la combinación de albúmina sérica bovina al 3% y la leche al 3% (A) diluyente (suero y conjugado) y bloqueador, respectivamente, (B) bloqueador y diluyente (suero y conjugado) respectivamente. El antígeno fue empleado a la concentración de 5 µg/mL, los sueros testigo positivo (▲) y negativo (●) a las diluciones 1:320-1:10 000 y el conjugado de peroxidasa-anti-YgM humana obtenida en cabra a la dilución 1:10 000.

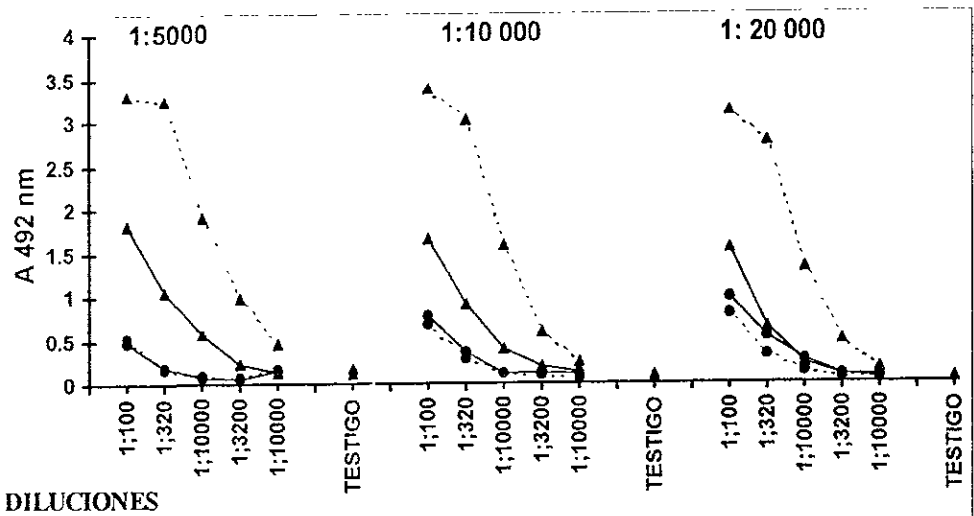


Figura 9 Titulación del conjugado para la detección de IgM dirigida contra el estadio adulto de *T. spiralis* en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizó el antígeno a las concentraciones de 0 (—) y 5 (---) µg/mL, el bloqueador utilizado fue ASB 3% los sueros testigo positivo (▲) y testigo negativo (●) a las diluciones 1:100-1:10 000 y el conjugado peroxidasa anti-IgM humana obtenida en cabra a las diluciones 1.5000, 1.10 000y 1:20 000, utilizando como diluyente la LECHE 3%, en ambos.

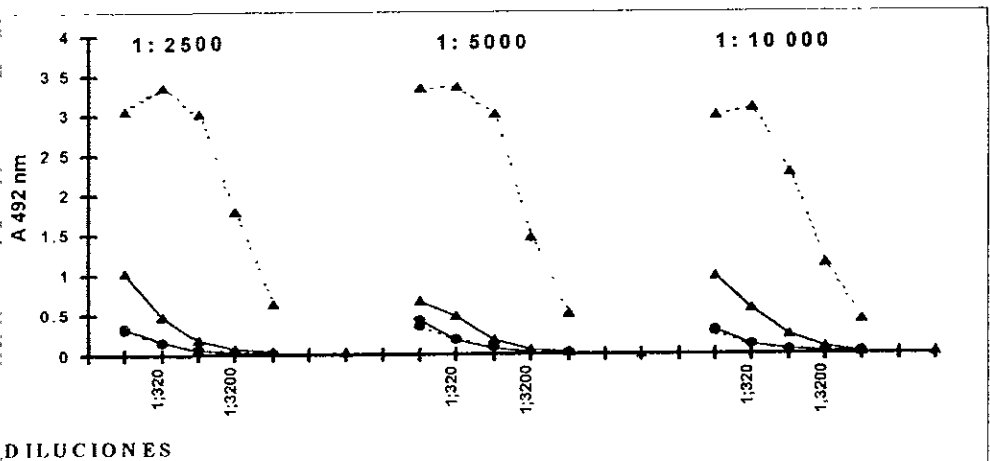


Figura 10 Titulación del conjugado para la detección de IgG dirigidos contra el estadio adulto de *T. spiralis* en el ensayo de ELISA. En este ensayo se utilizó el antígeno a las concentraciones de 0 (—) y 5 (---) µg/mL, los sueros testigo positivo (▲) y testigo negativo (●) a las diluciones 1:100-1:10 000 y el conjugado peroxidasa-anti-IgG humana obtenida en cabra a las diluciones 1:2500, 1:5000 y 1.10 000, el bloqueador y diluyente del suero y conjugado empleado fue gelatina al 0.25%.

TABLA 8.- CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LOS ENSAYOS DE ELISA

CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE LAS CLASES IgM E IgG DIRIGIDOS CONTRA EL ESTADIO ADULTO DE <i>T. spiralis</i>.		
	IgM	IgG
ANTÍGENO	5.0 mg/mL	5.0 mg/mL
BLOQUEADOR	ASB al 3%	GELATINA al 0.25%
SUEROS	1:320/LECHE al 3%	1:320/GELATINA al 0.25%
CONJUGADO	1.20 000/LECHE al 3%	1.5000/GELATINA al 3%

Análisis de los sueros testigo negativo y de otras parasitosis, por ELISA.

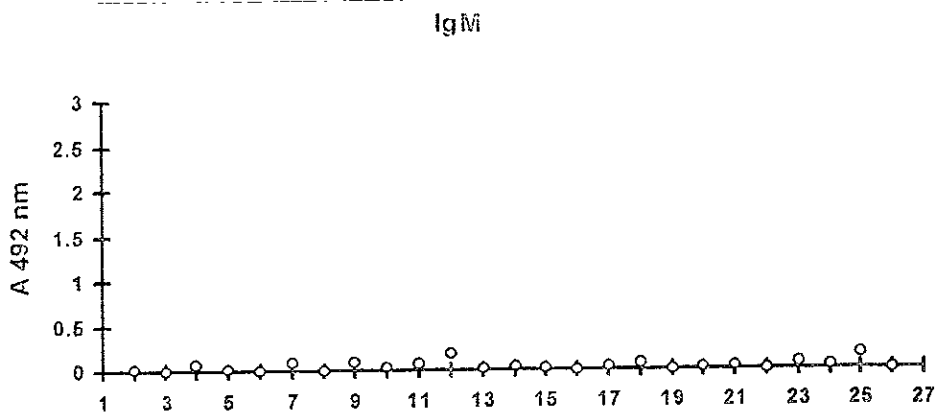
El análisis de los 25 sueros obtenidos de individuos aparentemente sanos con análisis coproparásitoscopico negativo, mostrados en las figuras 11 y 12 permitió verificar que las condiciones en que se efectuaron los ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos de los isótopos IgM e IgG, dirigidos contra el estadio adulto, fueron optimas, ya que la reactividad de los sueros de los individuos aparentemente sanos fue baja, presentando un promedio de 0.0426 y 0.127 y una desviación estándar de 0.0472 y 0.1045 para IgM e IgG, respectivamente

A partir de las absorbancias obtenidas en este grupo de sueros, se calcularon los valores de corte (media mas tres desviaciones estándar) para los ensayos de ELISA en la determinación de anticuerpos IgM e IgG, los cuales resultaron ser de 0.18 y 0.43, respectivamente.

El análisis de la reactividad cruzada de los anticuerpos IgM e IgG hacia el EST-Ad en los individuos con otras parasitosis se muestra en la figura 13. En ésta se puede observar que la reactividad cruzada de los anticuerpos IgM fue menor que la observada para los anticuerpos IgG (menores de 0.2 y 1.6, respectivamente). La reactividad cruzada de los anticuerpos IgM se detectó en un individuo infectado con *Endolimax nana* (amiba), en un paciente infectado con *Giardia lamblia*, en un individuo infectado con *Ascaris lumbricoides* y en un paciente infectado con *Trichouris trichiura*.

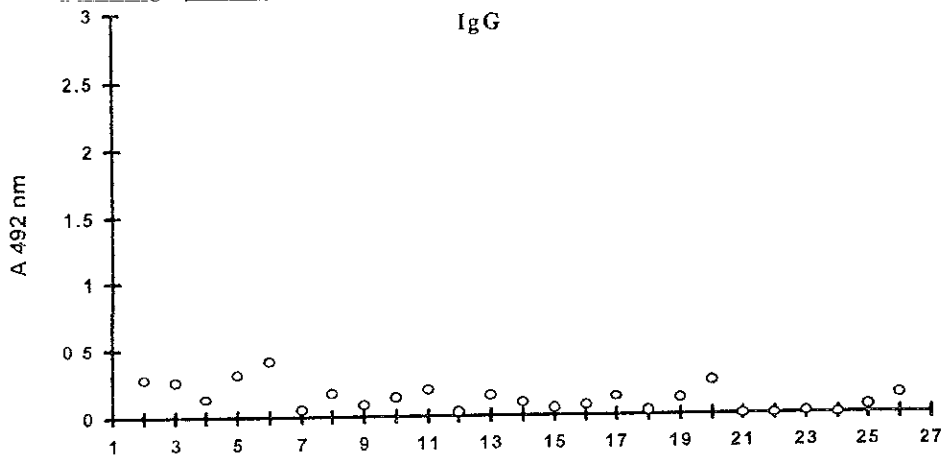
La mayor reactividad cruzada fue presentada por los anticuerpos de la clase IgG, de tres individuos infectados con *Ascaris lumbricoides*, de un individuo infectado con *Trichouris trichiura* y de un individuo con parasitosis mixta (*Giardia lamblia-Trichouris trichiura*) (Figura 14).

En las figuras 15 y 16 se presenta la reactividad promedio de los anticuerpos IgM e IgG hacia el adulto de *T. spiralis* de los individuos con otras parasitosis o infecciones mixtas, en ellas se demuestra que los grupos infectados con *Endolimax nana* y *Trichouris trichiura* presentaron la máxima reactividad cruzada en los anticuerpos de clase IgM y IgG respectivamente.



INDIVIDUOS SANOS

Figura 11 Análisis de los niveles de anticuerpos séricos de la clase IgM dirigidos hacia el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* en individuos aparentemente sanos. En este ensayo se utilizó el antígeno a la concentración de $5\mu\text{g}/\text{mL}$, bloqueando con ASB al 3%, el suero diluido 1:320 y el conjugado 1:20 000 en Leche al 3%



INDIVIDUOS SANOS

Figura 12 Análisis de los niveles de anticuerpos séricos de la clase IgG dirigidos hacia el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* en individuos aparentemente sanos. En este ensayo se utilizó el antígeno a la concentración de $5\mu\text{g}/\text{mL}$, el suero diluido 1:320 y el conjugado 1:5 000 utilizando como diluyente y bloqueador gelatina al 0.25%

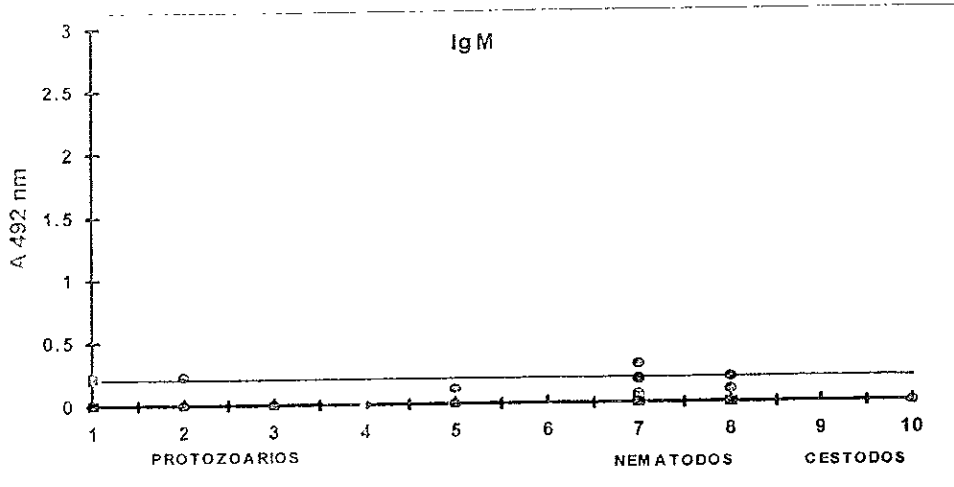


Figura 13. Análisis de la reactividad cruzada de los anticuerpos séricos de la clase IgM hacia el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* en individuos infectados con otros parásitos. Columnas. 1. *G. Lambia*, 2. *E. nana*, 3. *E. coli*, 4. *T. gondii*, 5. *E. histolytica*, 7 *A. lumbricoides*, 8 *T. trichura*, 10 *C. Cellulosae*. El valor de corte (—), es $\bar{X} + 3\sigma$ de individuos aparentemente sanos.

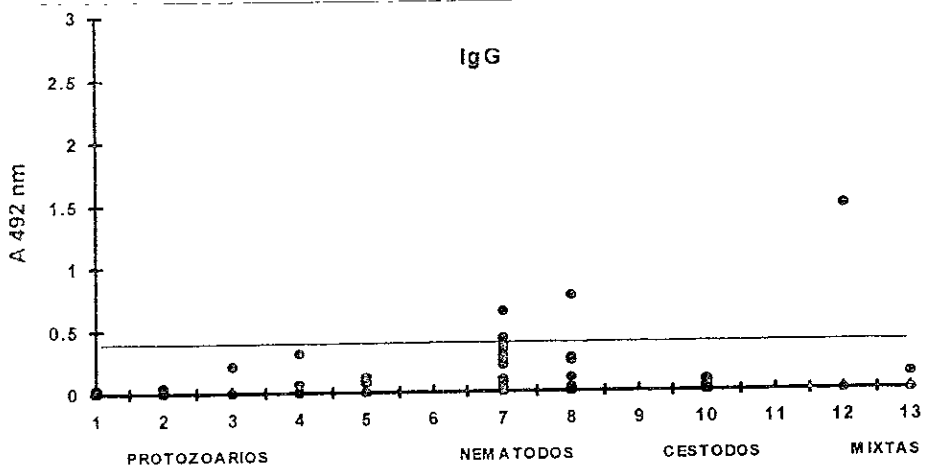
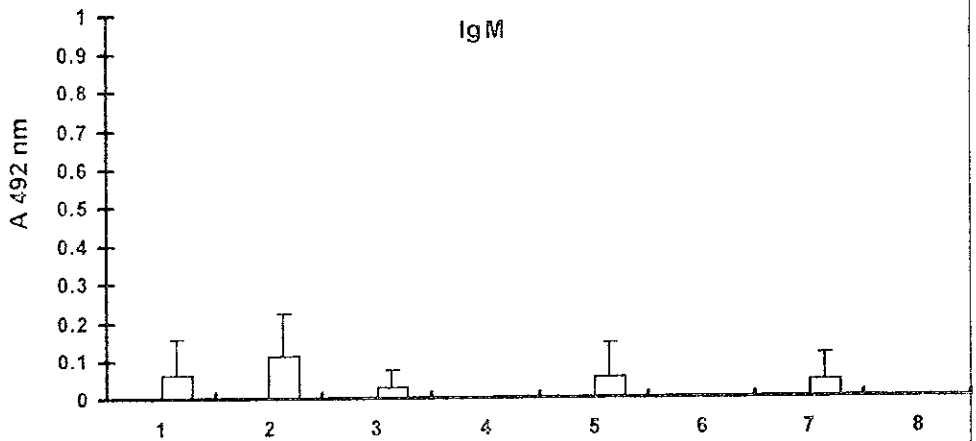
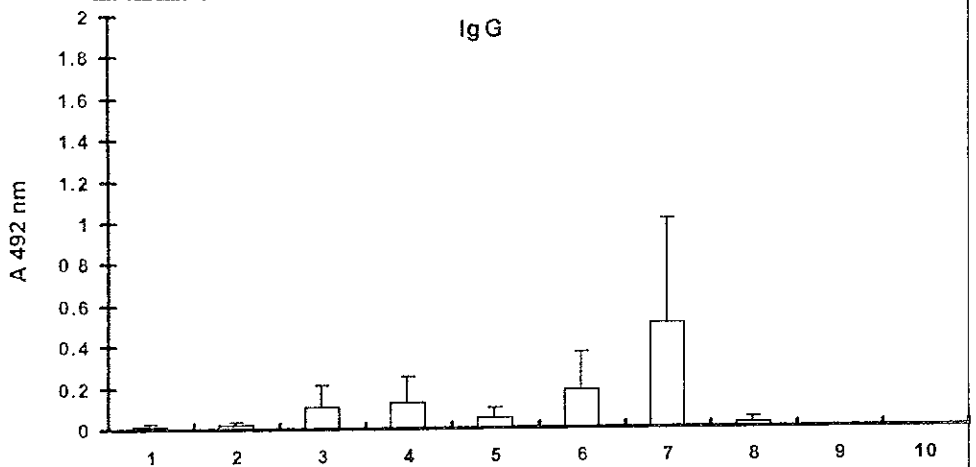


Figura 14 Análisis de reactividad cruzada de los anticuerpos séricos de la clase IgG hacia el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* en individuos infectados con otros parásitos. Columnas: 1 *G. lambia* (G l), 2. *E. nana* (E n), 3. *E. coli*, 4. *T. gondii*, 5 *E. histolytica*, 7 *A. lumbricoides*, 8 *T. trichura* (T t), 10 *C. Cellulosae*, 12 *G. lambia-T. trichura*, 13 *G. lambia-E. nana*. El valor de corte (—), es $\bar{X} + 3\sigma$ de individuos aparentemente sanos



PARÁSITOS

Figura 15 Análisis estadístico de la reactividad cruzada de los anticuerpos séricos de la clase IgM de individuos infectados con otros parásitos, hacia el extracto total del estadio adulto de *T. spiralis*. Columnas. 1. *G. lamblia* (n=7), 2. *E. nana* (n=2), 3. *E. histolytica* (n=4), 4. *E. coli* (n=1), 5. *A. lumbricoides* (n=12), 6. *T. gondii* (n=3), 7. *T. trichiura* (n=7), 8. *C. Cellulosae* (n=1)



PARÁSITOS

Figura 16 Análisis estadístico de la reactividad cruzada de los anticuerpos séricos de la clase IgG de individuos infectados con otros parásitos, hacia el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis*. Columnas: 1. *G. lamblia* (n= 7), 2. *E. nana* (n=2), 3. *E. coli* (n=1), 4. *T. gondii*(n=3), 5. *E. histolytica* (n=4), 6. *A. lumbricoides* (n=12), 7. *T. trichura* (n=6), 8. *C. cellulosae* (n=1), 9. *G. lamblia-E. nana* (n=1), 10. *G. lamblia-T. trichiura* (n=1)

Análisis de la respuesta de los niveles de IgM e IgG dirigida contra el extracto soluble del adulto de *T. spiralis* en los individuos involucrados en el brote de trichinellosis, a lo largo de la infección.

La respuesta de anticuerpos de la clase IgM (figura 17) fue baja, en la mayoría de los individuos con trichinellosis sintomática a la semana 3 postinfección, incrementó a la semana 5 y alcanzó su máximo a la semana 7 postinfección, posteriormente los niveles de anticuerpos disminuyeron gradualmente hasta alcanzar el mínimo a la semana 57, en que finalizó el estudio.

El análisis longitudinal del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos de la clase IgG dirigidos contra el EST-Ad de *T. spiralis* efectuado en los sueros de individuos involucrados en el brote de trichinellosis muestra que durante la semana 3 postinfección la producción de esta inmunoglobulina fue baja en la mayoría de los individuos con trichinellosis, la respuesta alcanzó su máximo en la mayoría de ellos, a la semana 5 y 7 postinfección, y a partir de la semana 15 comenzó a disminuir hasta alcanzar niveles muy bajos en las semanas 37 y 57 (figura 18). La tendencia antes mencionada es corroborada en la figura 20.

Por otra parte, en los individuos asintomáticos, los anticuerpos de la clase IgM e IgG presentaron una muy baja reactividad hacia los antígenos del estadio adulto (figura 17 y 18, respectivamente) en las semanas 4, 12 y 57 en que se tomaron las muestras.

El análisis individual de la respuesta de anticuerpos de las clases IgM e IgG dirigidos contra el estadio adulto de *T. spiralis* (figura 19) reveló una gran variabilidad de los niveles y de la cinética de anticuerpos presentada en los individuos sintomáticos.

Tomando como referencia los valores de corte de la población de individuos con otras parasitosis y la cinética individual de niveles de anticuerpos contra el EST-Ad, en la población de individuos infectados con *T. spiralis* (20), se observó que el 50% de los pacientes presentó una mayor producción de IgG, el 10% una mayor producción de IgM y el 40% presentó niveles similares de ambas clases de anticuerpos.

Por otra parte no se encontró diferencia significativa entre los niveles de anticuerpos detectados en la población de individuos sintomáticos con biopsia positiva o negativa.

Con el valor de corte obtenido de los individuos aparentemente sanos e infectados con otras parasitosis se determinó el porcentaje de detección de los anticuerpos séricos de las clases IgM e IgG dirigidos contra el EST-Ad de *T. spiralis*, en los ensayos de ELISA.

Así, con el valor de corte de los individuos aparentemente sanos, se determinó que la IgM permite, el 100% de detección de individuos con trichinellosis sintomática a la semana 7 postinfección, en cambio a la semana 5 la IgG,

permitió detectar el 75% de los individuos enfermos, sin detectar a ningún individuo asintomático con ambas inmunoglobulinas (tabla 9).

El porcentaje máximo de detección de pacientes con trichinellosis sintomática tomando como referencia el valor de corte de los individuos infectados con otras parasitosis fue obtenida con la determinación de los anticuerpos de la clase IgM y resultó ser del 93% a la semana 7 postinfección. En cambio, con la IgG fue del 64% a la semana 5 postinfección (tabla 10).

Finalmente al realizar el análisis de varianza entre las absorbancias obtenidas en los individuos con trichinellosis sintomática a las diferentes semanas en que se efectuó el estudio y para cada clase de anticuerpos no fue significativo. Sin embargo el análisis de varianza de los niveles las absorbancias obtenidas en este mismo grupo a las diferentes semanas postinfección, con el grupo de individuos aparentemente sanos y con el grupo de otras parasitosis, mostró que las absorbancias obtenidas en el grupo de individuos aparente mente sanos fue proporcionalmente menor que las obtenidas en el grupo con otras parasitosis en con ambos anticuerpos. A su vez las absorbancias obtenidas en éste ultimo grupo fue proporcionalmente menor a las obtenidas en el grupo de individuos con trichinellosis sintomática.

En cuanto a los signos, síntomas y parámetros clínicos observados en los pacientes con trichinellosis sintomática a la tercera semana postinfección, se detectó que los síntomas registrados principalmente fueron fiebre (95%), mialgias (75%), edema (65%), cefalea (45%), debilidad muscular (35%) y diaforesis (15%). A partir de estos datos se determinó que el 58% de esta población presentaron los síntomas característicos de la trichinellosis (fiebre, edema periorbital y mialgia) (tabla 11), y de éste grupo el 100% de los pacientes sintomáticos biopsia muscular negativa presentaron los síntomas característicos de la trichinellosis y solo de 75% los que presentaron la biopsia positiva.

Y los parámetros clínicos analizados en el grupo de individuos con trichinellosis sintomática, tomando como valores de referencia: 300 esinófilos/mm³; 90 µg de IgE total /100 mL, 50 U/L de CPK, 200,000 a 400, 000 plaquetas/mm³, 18 mm/h velocidad de sedimentación globular (VES), 10,000/mm³ leucocitos, 250 U/L de DHL. Fueron elevados antes del tratamiento: así, se detectó que el 42% individuos sintomáticos presentaron leucocitosis el 42%; el 100% de eosinofilia; el 76% presentaron niveles elevados de IgE, del 100% los niveles elevados de CPK y los niveles de plaquetas fueron disminuidos en todos los pacientes. La velocidad de sedimentación fue elevada en el 59% y el 29% presentó DHL (Tabla 12).

Finalmente en la semana 6 postinfección que correspondió a una semana después de haber terminado el tratamiento la mayoría de los pacientes, presentaban valores similares a los valores de referencia para cada uno de los

datos clínicos. Excepto para los pacientes 2, 3 y 8, los cuales concluyeron el tratamiento al término de la semana 5 postinfección.

Los pacientes sintomáticos presentaron un tiempo de incubación de 9 a 25 días con un promedio de 16 días, el tiempo de evolución fue de 3 a 15 días, con un promedio de 8 días.

Por lo que respecta al análisis de varianza de los signos, síntomas y parámetros clínicos de los pacientes sintomáticos con la respuesta de anticuerpos IgM e IgG en la tercera semana y al final del tratamiento, no se encontró correlación alguna entre estos parámetros

En cuanto al tratamiento los pacientes recibieron diferentes medicamentos antihelmínticos entre los que destacan el mebendazol y tiabendazol, así como prednisolona usada solo en algunos pacientes.

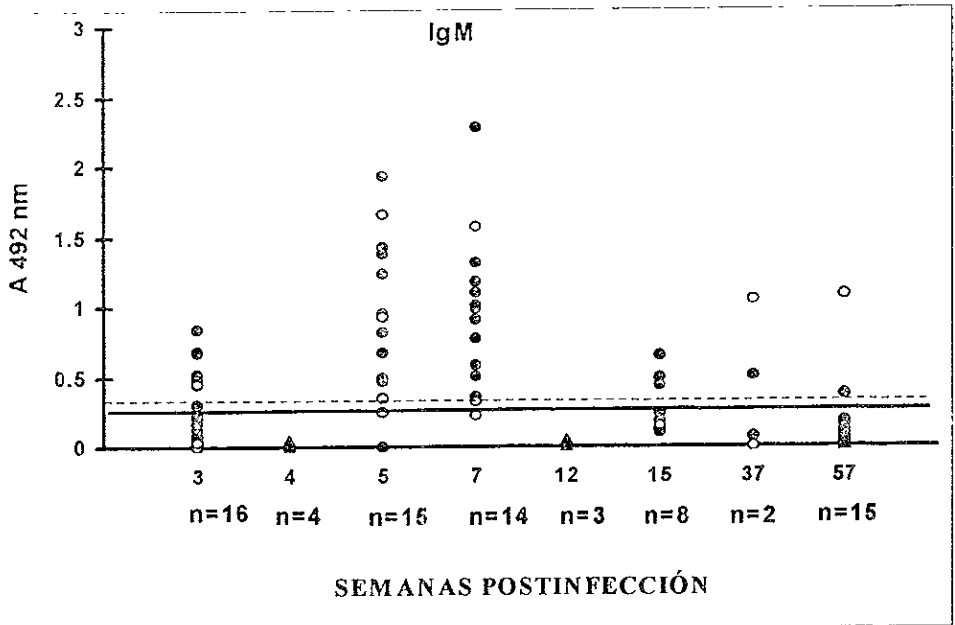


Figura 17. Determinación por ELISA de anticuerpos séricos de la clase IgM dirigidos contra el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* (EST- Ad) de individuos con trichinellosis sintomáticos biopsia positiva (●), biopsia negativa (○) y asintomáticos (▲). El ensayo de ELISA se realizó utilizando 5µg/mL de EST-Ad, los sueros a la dilución 1 320 y el conjugado de peroxidasa-anti-IgM obtenida en cabra a la dilución 1:20 000. $\bar{X} + 3\sigma$ de la población de individuos con otras parasitosis (---) $\bar{X} + 3\sigma$ de la población de individuos sanos (—)

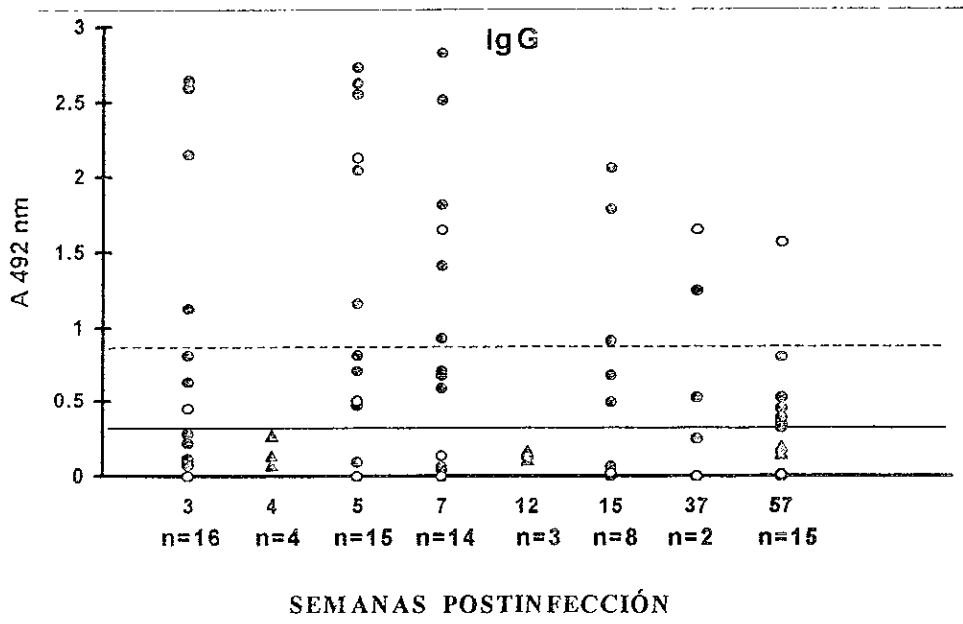


Figura 18. Determinación por ELISA de anticuerpos séricos de la clase IgG dirigidos contra el extracto soluble total del estadio adulto de *T. spiralis* (Est-Ad) por individuos con trichinellosis sintomática biopsia positiva (●), biopsia negativa (○) y asintomáticos (▲). El ensayo de ELISA se realizó utilizando 5µg/ml de EST-Ad. Los sueros a la dilución 1:320 y el conjugado de peroxidasa-anti-IgG obtenida en cabra a la dilución 1:5000. $\bar{X} + 3\sigma$ de individuos con otras parasitosis (---), $\bar{X} + 3\sigma$ de individuos aparentemente sanos (—)

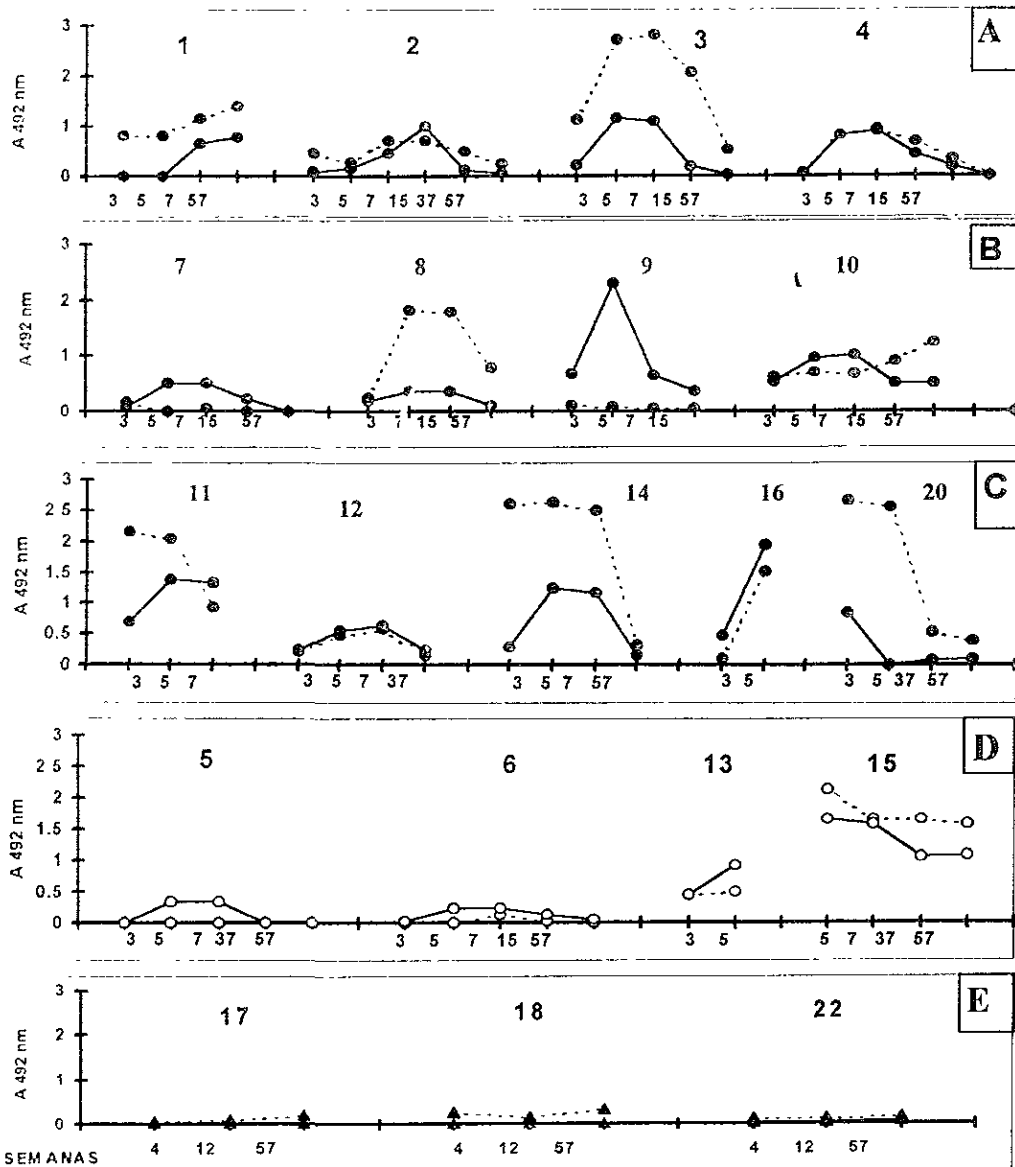


Figura 19. Análisis longitudinal de la respuesta de anticuerpos de las clases IgM (—) e IgG (---) dirigidos contra el EST-Ad en los individuos involucrados en el brote de trichinellosis. El ensayo de ELISA se llevo a cabo bajo las condiciones óptimas. Panel A, B y C, individuos con trichinellosis sintomática biopsia positiva (●), Panel D, individuos con trichinellosis sintomática biopsia negativa (○) y Panel E, individuos asintomáticos (▲).

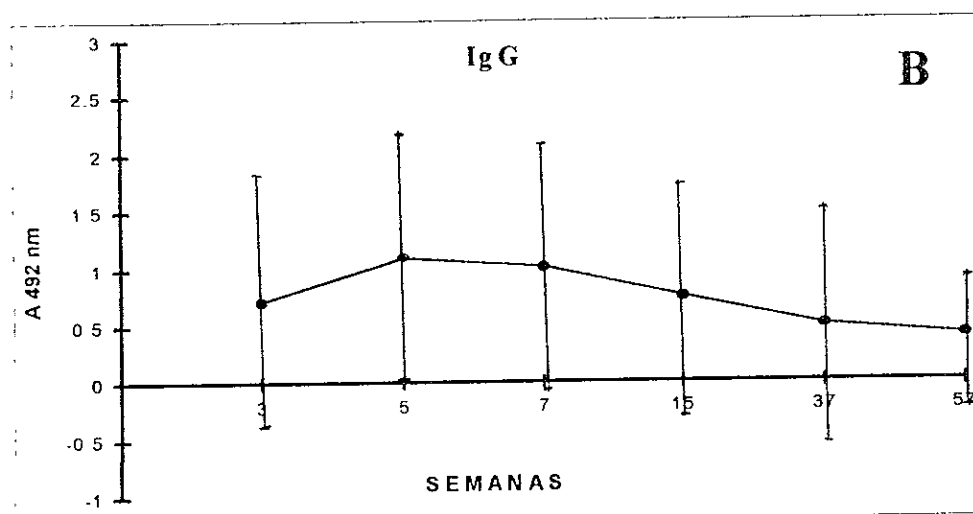
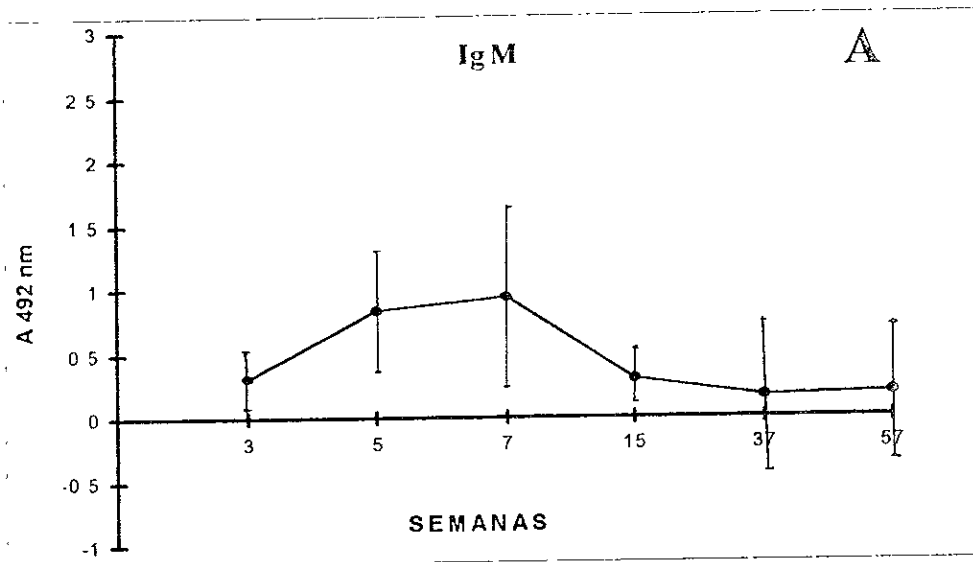


Figura 20. Análisis estadístico de la respuesta de los anticuerpos de la clase IgM (A) e IgG (B) dirigidos contra el estadio adulto de *T. spiralis* (EST-Ad) en los sueros de individuos con trichinellosis sintomática biopsia positiva y negativa. Cada punto representa la media de los valores de absorbancia de todos los individuos analizados en cada semana postinfección y la barra una desviación estándar

TABLA 9. SENSIBILIDAD DE LOS ENSAYOS DE ELISA (TESTIGO POSITIVO).

PORCENTAJE DE DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS DE LAS CLASES IgM E IgG DIRIGIDOS CONTRA EL ESTADIO ADULTO DE <i>T. spiralis</i> TOMANDO EL VALOR DE CORTE OBTENIDO DEL GRUPO DE INDIVIDUOS APARENTEMENTE SANOS.				
SEMANA POST-INFECCIÓN	IgM		IgG	
	SINTOMÁTICOS %	ASINTOMÁTICOS %	SINTOMÁTICO S %	ASINTOMÁTICOS %
3	50		43.7	
4		0		0
5	100		68.7	
7	100		71.4	
12		0		0
15	50		31.2	
37	40		60	
57	20	0	26	0

TABLA 12.- DATOS CLÍNICOS PRESENTADOS POR LOS PACIENTES CON TRICHINELLOSIS EN LA TERCERA SEMANA POSINFECCIÓN.

PACIENTE No	Eosinófilos ($1 \times 10^3/\text{mm}^3$)			BM	IgE total (1×10^2)		Plaquetas ($1 \times 10^5/\text{mm}^3$)		CPK ($1 \times 10^2 \text{U/L}$)		
	4-8	2-3.9	0.5-2		2-3	<1.07	1-2	<1	4-7	1-3.9	<0.6
3	+			+	+		+			+	
6	+			-	+		+			+	
9	+			+		+		+		+	
13	+			-	+			+		+	
20	+			-	+			+		+	
1	+	+		+	+		+			+	
2		+		+		+	+			+	
8		+		+		+		+		+	
10		+		+	+		+			+	
11		+		+		+	+			+	
12		+		+	+		+			+	
16		+		+		+	+				+
4			+	+	+			+			+
5			+	-	+			+		+	
7			+	+	+			+		+	
14			+	+	+		+			+	
15			+	-	+			+	+		

DISCUSIÓN

El diagnóstico de la trichinellosis se basa en criterios clínicos, epidemiológicos y en algunos casos por análisis parasitológico ^(citado en Salinas y col., 1993). Considerando que no siempre se tiene resultados positivos en el diagnóstico clínico y en el diagnóstico confirmativo, el diagnóstico serológico ha sido reconocido como un método potencial para detectar la infección con un parásito determinado aún en la ausencia de síntomas clínicos distintivos o aislamiento del parásito ^(citado en: Chapa y col., 1989). Así, el desarrollo de métodos sensibles y específicos para el diagnóstico de esta parasitosis es relevante en nuestro país.

En este estudio se planteó por vez primera la utilización de un extracto antigénico proveniente del estadio adulto de *T. spiralis* para analizar longitudinalmente la respuesta de anticuerpos séricos de las clases IgM e IgG, en pacientes con trichinellosis por ensayos de ELISA. El porcentaje de detección de pacientes con trichinellosis determinada en este trabajo para IgM fue de 43, 86, 93, 37, 40 y 16% y para IgG de 25, 64, 36, 25, 40 y 8.3% durante las semanas 3, 5, 7, 15, 37, y 57 postinfección, respectivamente.

La mayor sensibilidad obtenida con ambas inmunoglobulinas, se detectó durante las primeras semanas (3, 5 y 7), estos datos coincidieron con los reportados por Salinas y col. (1993) quienes analizaron la respuesta longitudinal de anticuerpos totales, dirigidos contra extractos totales de adulto (Ad), de larvas musculares (LM) y de larvas recién nacidas (LRN) por ELISA, y encontraron a partir de la tercera semana postinfección una sensibilidad del 43% para Ad y del 68% para LRN, las cuales fueron mayores que al emplear como antígeno el extracto total de LM (25%). Estos investigadores demostraron además que el porcentaje de detección obtenido con el EST-Ad se incrementó considerablemente durante las siguientes semanas (5 y 7). Dicha respuesta disminuye a partir de la semana 15 hasta finalizar el estudio (57 semanas postinfección), sin embargo el porcentaje de detección obtenido con estos dos antígenos (Ad y LRN), fue mejorada por el EST de LM a partir de la quinta semana (94%) y hasta la finalización del estudio.

Knapen y col. (1982) reportaron que esta sensibilidad es mejorada al detectar inmunoglobulinas específicas empleando el antígeno de EST-LM, en ensayos de ELISA, ya que durante las primeras semanas postinfección detectaron una sensibilidad muy alta para IgG e IgM (100 y 86% respectivamente), en comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo al emplear EST-Ad con estas mismas inmunoglobulinas.

Por otra parte, Pakpinol y col. (1992), han demostrado un mejor resultado al utilizar antígenos de secreción y excreción (ES) de LM en ELISA, al obtener el 100% de detección con IgG, a partir del día 57 postinfección (8 semanas) hasta el día 120 postinfección (17 semanas). Cabe mencionar que este antígeno tiene

componentes específicos, y además mejora la sensibilidad de la técnica en comparación con nuestro antígeno (EST-Ad), sin embargo estos autores encontraron que durante la tercera semana postinfección (23 días) el diagnóstico de esta parasitosis resulta negativo (0% de detección), en cambio en el presente trabajo al emplear como antígeno el EST-Ad para la detección de IgG se logra detectar a un 25 y 64% de los pacientes durante la tercera y quinta semana postinfección, respectivamente.

En estudios similares utilizando el ELISA, Marakote y col. (1991) y Feldmeier y col. (1987, citado por Marakote y col., 1991), analizaron la respuesta de anticuerpos de la clase IgG e IgM específicos para el extracto somático (S) de larva muscular y demostraron que el mayor porcentaje de detección de pacientes con trichinellosis fue de 85.7 y 100%, con ambas inmunoglobulinas durante los días 46 a 63 (6 a 9) semanas postinfección. Pero durante los primeros 22 a 28 días (3 a 4 semanas) postinfección, ambos estudios coincidieron con una sensibilidad baja. Con respecto a la respuesta de IgM Marakote y col. Sólo detectaron el 25% de los pacientes a los 23 días (3-4 semanas), en cambio en nuestro trabajo se obtuvo un mejor resultado al emplear como antígeno el EST-Ad, durante las semanas 3 y 5 postinfección, alcanzando a detectar el 43 y 86 % de los pacientes respectivamente, lo que nos sugiere que con el EST-Ad se detecta IgM mas tempranamente que al emplear el antígeno S.

Por lo que respecta a la detección de anticuerpos de la clase IgG, dirigida hacia el antígeno de la larva muscular los estudios de Morakote *et al* y Feldmeier *et al*. Durante las primeras semanas postinfección resultó en un mayor porcentaje de detección (>50%) que al utilizar EST-Ad. Morakote reportó un 68.7% de detección a los 23 días postinfección mientras que Feldmeier reportó sólo al 61%. En cambio, al emplear EST-Ad nosotros detectamos al 25% de individuos sintomáticos durante la tercera semana postinfección y el 64% durante la quinta semana, este ultimo porcentaje de detección fue el mas alto en todo el tiempo que se efectuó el análisis.

En un estudio realizado por Alcántara y Méndez (1996) en el que analizaron la respuesta específica de las subclases de IgG e IgG total hacia los antígenos TsL-1 (antígenos de superficie esticosomal de la LM), por ELISA en pacientes con trichinellosis a lo largo de un año de infección, reportaron que a la tercera semana postinfección se detecta al 75% de los enfermos al determinar anticuerpos de la subclase IgG3 y al 43% con IgG1, pero a partir de la semana 5 y hasta la finalización del estudio (semana 57) se detectaron en el 100% de los casos todas las inmunoglobulinas antes mencionadas, por lo tanto, el diagnóstico de la trichinellosis se mejora cuando se utiliza antígenos purificados de LM en comparación con el EST-Ad.

En cuanto a la reactividad cruzada de los anticuerpos de individuos con otras parasitosis, la más alta se observó en los pacientes infectados con *Ascaris lumbricoides* y *Trichuris trichiura* en la detección de ambas clases de anticuerpos (IgM e IgG), estos sugiere que ambos nemátodos comparten algunos determinantes antigénicos con el estadio adulto de *Trichinella spiralis* ya que pertenecen a la misma familia. Como la molécula de 94kDa que fue encontrada en los tres estadios de *T. spiralis* (larva muscular, larva recién nacida y el adulto), por medio de inmunoelectrotransferencia (Westernblot) por Salinas y col. (1993), quienes también sugirieron que esta molécula podría ser estadio específico y muy conservada. A este respecto, resulta interesante un estudio efectuado por Bundy y col., en 1991, quienes observaron también el reconocimiento de un grupo de proteínas de 17 a 146 kDa en el extracto total de *Trichiuris trichiura* en pacientes con trichuriasis, que incluía un componente de 94 kDa, el cual tuvo reactividad cruzada con otro componente del mismo peso molecular presente en el estadio adulto de *Ascaris lumbricoides*, en los productos de secreción/excreción de *Toxocora canis* y en la LM de *T. spiralis* (citado en: Salinas y col 1993). Estos estudios confirman la existencia de componentes que ocasionan la reactividad cruzada observada y que se ha conservado evolutivamente o a través de su ciclo de vida en varias especies de nemátodos parásitos por lo que es probable que realicen una función biológica importante. Por otro lado, no se observamos correlación entre los síntomas y parámetros clínicos de la trichinellosis con los niveles de anticuerpos (IgM e IgG) detectados contra el EST-Ad de *T. spiralis*. Por lo que no se les puede asociar con las alteraciones de los parámetros clínicos ni con la sintomatología observada en los pacientes.

CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones óptimas en nuestros ensayos para la detección de anticuerpos de la clase IgM dirigidos contra el EST-Ad fueron, 5µg/mL de antígeno, utilizando ASB al 3% como bloqueador, la dilución del suero empleada fue 1:320 y el conjugado 1:20 000 diluidos en leche al 3%. Y para la clase IgG la concentración de antígeno óptima fue de 5µg/mL, el bloqueador y diluyente del suero y del conjugado empleado fue gelatina al 0.25% y las diluciones empleadas fueron 1:320 y 1:5000.
- 2) La respuesta de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG dirigidos contra el EST-Ad, son detectada a partir de la semana 3 postinfección, incrementan a las semanas 5 o 7 y posteriormente disminuyen hasta el termino del estudio (57 semanas postinfección).
- 3) Los porcentajes de detección de pacientes con trichinellosis más altos tomando como referencia el valor de corte de los individuos infectados con otras parasitosis, se lograron en la semana 5 y 7 con IgG (63%) e IgM (93%) respectivamente.
- 4) Los anticuerpos de clase IgG e IgM no permitieron diferenciar entre la fase aguda y la crónica de la trichinellosis
- 5) Los valores más altos de reactividad cruzada se observaron con individuos infectados con *Ascaris lumbricoides* y *Trichiura trichiuris*.
- 6) No existe correlación entre los síntomas, parámetros clínicos y los niveles de anticuerpos de las clases IgM e IgG durante la tercera semana dirigidos contra el adulto de *Trichinella spiralis*.

RESUMEN

El nemátodo *trichinella spiralis* es considerada una especie cosmopolita, debido a su capacidad para infectar animales silvestres y animales domésticos, además de humanos. A diferencia de otros parásitos su ciclo de vida transcurre en un sólo huésped, presentando así dos fases; la fase enteral y la fase parenteral.

Debido a la complejidad antigénica que presenta este parásito durante sus estadios y la falta de control en cuanto al índice de frecuencia en los países se han desarrollado varios métodos serológicos utilizando diferentes preparaciones antigénicas, sin embargo la especificidad y sensibilidad varía entre cada método y no ha permitido aún el establecimiento de métodos serológicos útiles en estudios epidemiológicos

Generalmente estos métodos emplean antígenos totales y purificados del estadio de larva muscular, se ha observado que la mayor sensibilidad se obtiene a partir de la semana 5 postinfección, al detectar anticuerpos clase o subclase específicos.

Por lo que evaluó la utilización del antígeno del estadio adulto de *trichinella spiralis* en el ensayo inmunoenzimático (ELISA previamente estandarizado) detectando anticuerpos específicos de clase IgM e IgG en individuos infectados con *trichinellosis*. El brote de *trichinellosis* fue estudiado a diferentes tiempos después de la infección en el transcurso de un año.

Las condiciones óptimas en el ELISA para la clase IgM dirigidos contra el EST-Ad fueron, 5µg/mL de antígeno, utilizando ASB al 3% como bloqueador, la diluciones 1:320 del suero y 1:20 000 conjugado ambos en leche al 3%. Y para la clase IgG la misma concentración, gelatina al 0.25% como bloqueador y diluyente del suero y del conjugado empleando las diluciones 1:320 y 1:5000 respectivamente.

Los resultados mostraron que la respuesta de anticuerpos específicos de clase IgM e IgG dirigidos contra el EST-Ad, son detectados a partir de la semana 3 postinfección, incrementando a las semanas 5 y 7, posteriormente se observan disminuídos hasta el término del estudio.

La determinación de IgM presentó la sensibilidad más alta, ya que permitió la detección del 83 y 93% de los pacientes durante las semana 5 y 7 postinfección respectivamente. Por otra parte la IgG solo se detecto al 63% de los pacientes en la semana 5 postinfección. Estos anticuerpos de clase IgG e IgM no permitieron diferenciar entre la fase aguda y la crónica de la *trichinellosis*.

La detección de anticuerpos IgM utilizando el EST-Ad mejora el diagnóstico temprano de la *trichinellosis* humana dado por otros métodos que utilizan diferentes preparaciones antigénicas obtenidas a partir del estadio adulto de *T. spiralis*, en cambio la detección de IgG contra dicho antígeno no resulta útil para el diagnóstico de esta parasitosis.

En estos ensayos no se encontró correlación entre los síntomas, parámetros clínicos y los niveles de anticuerpos de clase específica IgM e IgG dirigidos contra el EST-Ad de *Trichinella spiralis* por lo que la comparación de los resultados obtenidos con el análisis de los niveles de anticuerpos carece de pronóstico.

Con respecto a este nuevo método de diagnóstico, podemos concluir que la preparación antigénica del Est-Ad es más útil para el diagnóstico temprano de la trichinellosis humanas, en comparación con otras técnicas donde emplean diferentes preparaciones antigénicas; sin embargo debido a los bajos niveles alcanzados con ambas inmunoglobulinas en este estudio durante la tercera y quinta semana postinfección, que es cuando se podría realizar un buen tratamiento con antihelminantes evitando así el desarrollo del parásito, esta prueba resultaría negativa para aquellas personas con una baja infección ó con una respuesta inmunológica baja.

BIBLIOGRAFÍA

1. -Alcántara, P. y Correa, D. (1993). Human humoral immune response against *Trichinella spiralis*. J. Parasitol. 23 (5): 657-660.
2. -Alcántara, P., Gorodezky, C., Correa, D., Martínez-Marañón, R., Mayor, C. and Olivo, A. (1989) Diagnosis of human trichinosis by the enzyme-linked immunosorbent assay. Rev. Lat. Microbiol. 30:227-230.
3. -Alcántara-González, N. A., Méndez-Loredo, B. E. (1996). Análisis longitudinal de la respuesta de IgG subclase específica en el humano hacia los antígenos de superficie de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.
4. -Appleton, J. A., Bell, R. G., Homan, W. And Van Knapen, F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Parasitol. Today. 7(8): 190-192.
5. -Barrel-Connor, E., Davis, C. F., Hamburger, R. N. And Kagan, I. G. (1976): An epidemic of trichinosis after ingestion of wild pig in Hawaii. J. Infect. Dis., 133, 473-477.
6. -Barriga, O. O. (1977). Reactivity and specificity of *Trichinella spiralis* fractions in cutaneous and serological tests. J. Clin. Microbiol. 6(3): 274-279.
7. -Bruschi, F; Tassie, C. And Pozio, E. (1990). Parasite-specific antibody response in *Trichinella sp.* 3 Human infection: a one year follow up. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43 (2) 186-193
8. -Cabral-Soto, J., Vilcaña-Fuentes, H., Fragosos-Urbe, R. Y Contreras, A. (1990). Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Sal. Pub. Mex. 32 (5): 575-582.
9. -Capó, V., Silberstein, D. And Despommier, D. (1986). Immunocytolocalization of two protection-inducing antigens of *Trichinella spiralis* during its enteral phase in immune and nonimmune mice.
10. -Coltorti, E., Fernández, E. Y Santillán, G. (1987). Estandarización y evaluación de un ensayo inmunoenzimático para diagnóstico y seroepidemiología de triquinosis humana. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 29(6): 329-336.
11. -Correa, D., De la Rosa, J. L., Ortega-Pierres, M. G., (1996). En Trichinosis: Human epidemiology data in México from 1943 to 1993. Proceedings of the ninth International Conferencia on Trichinellosis México. 519-523.
12. -Chan, W.S. y Ko, R.C 1988. Comparison between standard ELISA and dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:892-894.

- 27.-Ivanoska, D., Cuperlovic, K., Gamble, H. R. and Murrell, D. (1989). Comparative efficacy of antigen and antibody detection tests for human trichinellosis. *Amer. Soc. Parasitol.* 75(1). 38-41.
- 28.-Kagan, I. G. And Norman, L. G. (1970). The serology of trichinosis. In: *Trichinosis in man and animals*. Gould s. E. 222-268.
- 29.-Knapen, V. F., Franchimoun, J. H., Verdonk, A. R., Stumpf, J. And Undeutsch, K. 1982. Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am. Trop. Med. Hyg.* 31(5): 973-976.
- 30.-Lillywhite 1991
- 31.-Linder, E. And L. Lundin, 1991. Isolation of an SBA lectin-reactive Glycoprotein (gp50) and its identification in *Shistosoma mansoni* larval and adult worm secretions. *Journal of Parasitology* 77: 391-401.
- 32.-Mahannop, P., Chaicumpa, W., Setasuban, P., Morakote, N. And Tapachaisri, P. (1992). Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory-secretory (ES) antigen. *J.Helminthol.* 66:297-304.
- 33.-Marakote, M., Khamboonruang, C., Sumprasert, V., Suphawuavakul, S., Marcanantachot, S. And Thantason, W. (1991). The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human trichinosis. *Trop. Med. Parasitol.* 42:172-174.
- 34.-Martínez-Marañón, R. (1985). Esta aumentando la triquinosis en México ¿Podría ser esto una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo? *Salud Públ. Méx.* 27:40-75.
- 35.-Martínez-Marañón, R., Ruiz-Fernández, M., Flores-Medina, M., Gallardo-Hernández, J. M., Longoria-Martínez, A., Rojas-Cisterna, F., Cortez-Cervantes, A., Escobar-Luján, M. Y Díaz-Castorena, M. G. (1977). Triquinosis en Zacatecas, Zac. *Prensa Med. Méx.* 11-12: 1278-1287.
- 36.-Matossian, R. M. (1975). Serodiagnosis by fluorescent antibody staining of an outbreak of trichinosis in Lebanon. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 69(3): 387-392.
- 37 -Nishiyama, T., Araki, T., Mizuno, N., Wada, T., Ide, T. and Yamaguchi, T. (1992). Detection of circulating antigens in human trichinellosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. And Hyg.* 86: 292-293.
- 38 -Norman, L. G. And Kagan, I. J. (1963). Bentonite, latex and cholesterol flocculation test for the diagnosis of trichinosis. *Publ. Heart Rep.* 78: 277-232.
- 39.-Ortega-Pierres, G. (1984). La caracterización de los antígenos de superficie del nemátodo parásito *Trichinella spiralis*. Estudio de su

- participación en los mecanismos de protección y su utilidad en el diagnóstico de la trichinellosis.
- 40 -Parkhouse, R M E And Ortega-Pierres, G. (1984). Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitol. 88: 623.
 - 41 -Pawlowski, Z. S. (1983). Clinical aspects in man. En: Campbell, W. C., Ed *Trichinella and trichinosis* Ed. Plenum Press. New York, USA. 367-394.
 - 42 -Pozio, E , La Rosa, E., Murrell, K. D. And Linchtenfeis J. R. (1992). Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol. 78(4): 654-659.
 - 43 -Pozio, E., La Rosa, E., Serrano, F. J., Barrat, J. Y Rossi, L. (1996). Environmental and human influence on the ecology of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in western Europe. Parasitol. 113: 527-533.
 - 44 -Rojas-Ortega, S., Reyes-Gutiérrez, E And Ponce de León- Rosales, S. (1989) Triquinosis esporádica. Sal. Pub. Méx 31(5). 658-663.
 - 45.-Rutemberg, E. J., Ljungatrom, I. Steerenberg, P. A. And Buys, J. (1975). Micro-system for the application of immunofluorescence and immunoenzyme methods in the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infection Ann. N. Y. Acad. Sci. 296-303.
 - 46 -Salinas-Tobón, M. R., Martínez-Marañón, R., Velasco-Castrejón, O. And Chapa-Ruiz, M. R. (1993). Serological analysis of human trichinellosis cases in México during the period of 1984-1990 by standardized ELISA assay. En: Campbell, W. C., Pozio, E. And Bruschi, F. Eds. Trichinellosis Ed. Instituto Superiore di Sanita Press. Roma, Italis. 491-496.
 - 47 -Salinas-Tobón, M.R., Chapa-Ruiz, M R. and Ortega-Pierres, M. G. (1993). Evaluation of *Trichinella spiralis* surface antigens from muscle larva, adult and newborn larva for the diagnosis of human trichinellosis. En Campbell, W. C., Pozio, E. And Bruschi, F. Eds. Trichinellosis Ed. Instituto Superiore di Sanita Press. Roma, Italia. 365-372.
 - 48 -Takahashi, Y., goto, C. And Kita, K. K. (1995). Ultrastructural study of *Trichinella spiralis* with emphasis on adult female reproductive organs. J. Helminthol. 69: 247-252.
 - 49 -Takahashi, Y., Uno, T., Mizuno, N., Tokuda, C., Shimazu, K. And Araki, T 1991. An immunocytochemical analysis of a class-specific antibody response against *Trichinella spiralis* in humans. J. Electron Microscop. 40: 136-142.
 - 50.-Todorova, V. K., Knox, D. P. and Kennedy M. W. (1995). Proteinases in the excretory/secretory products (ES) of adult *Trichinella spiralis* Parasitology, 111: 201-208.

- 51.-Todorova, V. K., Tankov, C. V. And Dimitrov, T. V. (1993). *Trichinella spiralis* characterization of circulating and immune-complex-associated antigens. Parasitol. Res. 79: 86-88.
- 52.-Toshima, N., Tsuney, A., Naoto, M., Tervo, W. Takeshi, I. And Tomio Y. (1992). Detección of circulating antigens in human trichinellosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86: 292-293.
- 53.-Wakwlin, D. 1993. *Trichinella spiralis*: Immunity, ecology and evolution. J. Parasitol. 79: 86-88.
- 54.-Wegesa, A. J., Sulzer and Avis V. O. (1971). Aslide antigen in the indirect Fluorescent antibody test for *Trichinella spiralis*. Immunology, 21:805.
- 55.-Wisnewski, N., Mcneil, M., Grieve, R. B. And Wassom , D. L. (1993). Characterization of novel fucosyl- and Tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle larva. Mol. Biochem. Parasitol. 61: 25-36.
- 56.-Yepez-Muliá, L. y Ortega-Pierres, G. (1994). Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la trichinellosis. Rev. Lat. Microbiol. 36: 127-138.
- 57.-Zamora-chávez, A., De la O-Cavazos, M. E., Bernal-Redondo, R. M., Berrones-Espericueta, D. Y Vázquez-Antoma, C. (1990). Triquinosis aguda en niños. Brote epidémico intrafamiliar en la ciudad de México. Bol. Med. Hosp. Infant. Méx. 47(6): 395-400.
- 58.-Zimmerman W. J. (1993). Control II: Surveillance in swine and other animals by muscle examination. In campbell W. C. Ed., "*Trichinella* and Trichinosis" Plenum: Press. New Yort N. Y.16: 515-547.

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