



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

00377
23

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DIAGNÓSTICO DE TRICHINELLOSIS
EQUINA POR MÉTODOS
MOLECULARES**

289344

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
P R E S E N T A

BIÓL. NOEMI VIVEROS GUZMAN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LILIÁN YÉPEZ MULÍA
DRA. CAMILA ARRIAGA DÍAZ
DRA. GUADALUPE ORTEGA-PIERRES

México, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ciudad Universitaria, D.F., 19 de enero 2001

Noemí Viveros Guzmán
de cuenta: 86292700
de expediente: 3991105
P r e s e n t e

Por la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión del **11 de diciembre del 2000**, aprobó el Jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Experimental)** del Posgrado en Ciencias Biológicas, integrado de la siguiente manera:

Presidente: Dra. Annie Pardo Semo
Secretario: Dra. Lilian Yopez Mulia
Vocal: Dra. Camila Arriaga Díaz
Suplente: Dra. Guadalupe Ortega-Pierres
Suplente: Dr. Hiram Olivera Díaz

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora

C.c.p. Miembros del Jurado.
C.c.p. Expediente del Alumno.

Este trabajo de tesis se realizó:

En el laboratorio de parasitología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN, Siglo XXI, IMSS y en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SAGAR, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia y la Dra. Camila Arriaga Díaz en colaboración con la Dra. Guadalupe Ortega Pierres del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

La realización de este trabajo fue posible gracias a las becas otorgadas por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Gran parte de esta tesis fue financiada por el apoyo que el CONACYT otorgó al proyecto No. 3905P-B9607

Para obtener el grado de Maestria en Ciencias y durante toda mi formación, desde la primaria, la Fundación de asistencia privada "**Alberto y Dolores Andrade**" me otorgó una beca, por lo cual expreso mi gran agradecimiento. En especial a la Lic. Marisela del Carmen Vélez Salas por el apoyo y confianza que siempre me brindó y por su gran dedicación a la fundación.

Dedico esta tesis a la **Sra. Dolores y a su esposo Alberto Andrade**, por la gran ayuda que nos han dado a todos los becarios de esta fundación en especial a mi persona. Gracias por pensar en los hijos de los trabajadores de su Empresa **Cremería Americana S.A. de C.V.** sin ello no hubiera sido posible el gran apoyo que nos ha dado su Fundación.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Por toda la confianza, dedicación y paciencia que siempre me ha brindado. Por darme la oportunidad de trabajar a su lado. También por todos los acertados consejos que desinteresadamente recibí y por su invaluable amistad.

A la Dra. Camila Arriaga Diaz

Por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de trabajo en el laboratorio de Inmunología del CENID-Microbiología, SAGAR. Por todo su apoyo, confianza, dedicación y amistad.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres

Por su valiosa asesoría durante la realización de este trabajo. Así como su apoyo constante y facilidades para la realización de este trabajo.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis. Por todo su apoyo, confianza y amistad. Además de permitirme la estancia en su laboratorio.

A mis amigas

Hilda, Nancy, Cruz, Aracelí, Patricia, Rocío, Leticia, Ivonne y Ruth. Por todos los momentos tan felices que compartimos y sobre todo por brindarme su valiosa amistad, la cual espero que perdure por mucho tiempo. Gracias por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio

Marta, Violeta, Edith, Luz María, Elvira, Víctor, Fernando, Lupita, Verónica, Josefina, Rodolfo, Felicitas, Ciro, Amanda, Gloria y Norma que me han facilitado el camino para llegar hasta aquí.

A todo el personal de la UIMEIP-Pediatría y del CENID-Microbiología, SAGAR, que tan desinteresadamente cooperó para la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A Dios:

Gracias, por enseñarme todo lo bello de la vida y hacerme sentir que cuando hay problemas, tú no nos abandonas, siempre estas conmigo.

A mis padres:

Ma. Teresa Guzmán y Maximino Viveros Escamilla. A ustedes entrego el esfuerzo de muchos años de estudio, durante los cuales sólo recibí lo mejor. Gracias por darme con su ejemplo constante la mejor herencia: mi carrera y ahora mi maestría

A mi familia:

Olga, Dario, Emigdio, Teresa Sarahí y Andrés, por la ayuda, cariño y apoyo que siempre me han brindado y la confianza que tienen en mí y que nunca defraudaré.

A la familia Morales Hurtado:

Por todo el amor que me han brindado siempre. Gracias por compartir tan bellos momentos a su lado. En especial a mis suegros Josefina y Marcelino, gracias por su gran paciencia y comprensión.

A la familia Reyes Santos:

Por todo el apoyo, paciencia y comprensión constante que siempre me han entregado. En especial a la Sra. Rebeca, al Sr. Jaime y la Sra. María, pues gracias a su amistad desinteresada supieron sembrar en mí el valor de la familia.

A la familia Montero Olmedo:

Por toda su gran amistad que tan desinteresadamente me han brindado en ese estado tan maravilloso donde viven, Oaxaca. Gracias por dejarme compartir con toda su familia tan gratos recuerdos que siempre llevaré conmigo.

Con todo mi amor para mi esposo Raúl:

Gracias, por elegirme como tu esposa y unir tu vida a junto a la mía. Durante todo este tiempo sólo he recibido lo mejor de ti. Sabes, todo el tiempo que hemos compartimos juntos hace que nuestro amor siga creciendo cada día más.

Te dedico esta tesis con todo mi amor, cariño y amistad. Te agradezco toda la comprensión, paciencia y los bellos momentos compartido a tu lado. Gracias.

Te amo.

INDICE

ABREVIATURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	v
1. INTRODUCCION	1
1.1 Taxonomía	2
1.2 Morfología	2
1.3 Ciclo de vida	4
1.4 Genotipos de <i>Trichinella</i>	4
1.5 Síntomas	7
1.6 Trichinellosis en México	8
1.7 Métodos de diagnóstico	11
1.8 Diagnóstico serológico	12
2. ANTECEDENTES	18
3. JUSTIFICACION	29
4.OBJETIVOS	30
5. MATERIAL Y METODOS	31
5.1 Parásitos	31
5.2 Mantenimiento del ciclo de vida y obtención de la larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> .	31
5.3 Obtención de las muestras de tejido muscular de animales de rastro	32
5.4 Digestión artificial.	33
5.5 Extracción del ADN	34
5.6 Cuantificación del ADN por espectrofotometría	36
5.7 Separación electroforética del ADN	36
5.8 Amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa	36
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSION	51
8. CONCLUSIONES	59
9. APENDICE	60
10. BIBLIOGRAFIA	61

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa sólida
E/S	excreción/secreción
g	gramo
h	hora
IET	Inmunoelctrotransferencia
kDa	kilodaltons
LPG	larvas por gramo
LRN	larvas recién nacidas
M	Molar
min	minutos
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
ng	nanogramos
nm	nanómetros
µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micras
pb	pares de bases
PBS	amortiguador de fosfatos salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pi	post-infección
rpm	revoluciones por minuto
S/E	superficie/esticosoma

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos acumulados de algunas enfermedades parasitarias en México durante 1997 y 1998.	1
Tabla 2. Frecuencia de signos clínicos presentados en los tres brotes de trichinellosis humana ocurridos en Francia e Italia ocasionados por el consumo de carne de caballo.	8
Tabla 3. Brotes de trichinellosis humana ocurridos en Italia y Francia de 1975 a 1998, ocasionados por el consumo de carne de caballo.	19
Tabla 4. Detección de la larva muscular de <i>Trichinella</i> en caballos de rastro, infectados naturalmente con el parásito.	22
Tabla 5. Comparación de los músculos de caballos infectados experimentalmente con <i>Trichinella spiralis</i> con diferentes dosis infectivas.	23
Tabla 6. Colectas de carne de caballo de los rastros de la República Mexicana, un rastro TIF y un rastro rural.	32
Tabla 7. Resultados del análisis de muestras de suero, diafragma y lengua de caballos de rastro TIF y rastro rural realizadas por ELISA, digestión artificial y PCR.	50

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfología de *Trichinella spiralis*. 3
- Figura 2.** Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. 5
- Figura 3.** Valores de densidad óptica (O.D.) de sueros de cerdos de traspatio obtenidos en ensayos de ELISA con a) el extracto crudo, b) los antígenos de superficie/esticosoma purificados o c) los antígenos de excreción/secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. 13
- Figura 4.** Antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* reconocidos por inmunoelectrotransferencia por sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. 14
- Figura 5.** Valores de densidad óptica (O.D.) de sueros de pacientes involucrados en un brote de trichinellosis humana usando preparaciones antigénicas de los tres estadios de *Trichinella spiralis*. 16
- Figura 6.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores oTsr y con diferentes concentraciones del ADN de larvas musculares de *Trichinella spiralis*, extraído de acuerdo a lo recomendado por Soulé y cols. (1993c). 40
- Figura 7.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra y con diferentes concentraciones del ADN de larvas musculares de *Trichinella spiralis*, extraído de acuerdo a lo recomendado por Bruford y cols. (1992). 41

- Figura 8.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando diferentes concentraciones del ADN de diafragma de carne de caballo no infectado al cual se le adicionaron 1200 larvas musculares de *Trichinella spiralis*. 43
- Figura 9.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando diferentes concentraciones del ADN del diafragma de un caballo infectado naturalmente con larvas musculares de *Trichinella spiralis* (9 LPG) y los iniciadores pPra. 44
- Figura 10.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y lengua (L) de los caballos del rastro Tipo Inspección Federal. 46
- Figura 11.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y lengua (L) de los caballos del rastro rural. 47
- Figura 12.** Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y lengua (L) de los caballos del rastro rural. 48

RESUMEN

El consumo de carne de caballo ha ocasionado varios brotes de trichinellosis humana en la Comunidad Europea involucrando aproximadamente a 3,000 personas. En México, no se ha considerado el caballo como transmisor de esta parasitosis, por lo que sólo en los rastros Tipo Inspección Federal (TIF), de los cuales la carne de caballo se exporta, se inspecciona para la presencia de *Trichinella*. Es importante que por un lado que, se conozca la prevalencia de la trichinellosis equina en nuestro país, y por otro lado, que se realice el diagnóstico de la trichinellosis equina en todos los rastros del país. A este respecto, el diagnóstico se realiza por métodos directos (digestión artificial y triquinoscopia) los cuales son poco sensibles, considerando que la carga parasitaria en caballos es en la mayoría de los casos baja. Por lo anterior, se requiere desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles y específicos. En este estudio se comparó la sensibilidad de métodos moleculares, serológicos y parasitológicos en el diagnóstico de la trichinellosis equina en dos rastros de caballos, un TIF y un Rastro Rural. Para esto, se obtuvieron muestras de diafragma y lengua de 170 caballos y se examinaron por PCR y digestión artificial. Las muestras de suero de estos caballos también se analizaron por ELISA para analizar la presencia de anticuerpos contra el parásito. Mediante el método de digestión artificial no se detectaron larvas musculares de *Trichinella*. Sin embargo, por ELISA, se detectaron anticuerpos específicos contra *Trichinella* en 7% y 17% de las muestras de suero analizadas de los rastros TIF y Rural respectivamente. Por PCR, 2% y 14% el de las muestras de diafragma del TIF y Rural fueron positivas a *Trichinella* respectivamente. Considerando que por PCR se detecta la presencia del parásito, a diferencia del ELISA, donde la presencia de anticuerpos puede deberse a una infección pasada o presente, la técnica de PCR puede ser útil y alternativo para identificar animales que están infectados por *Trichinella* y que no son detectados por otros métodos de diagnóstico.

I. INTRODUCCION

Tanto en nuestro país como en otras partes del mundo existe un considerable número de personas que padecen enfermedades causadas por parásitos, protozoarios y helmintos. Estas infecciones tienen un gran impacto en salud pública en varios países del urbe afectando el crecimiento y desarrollo de sus habitantes.

En México, existen muchos casos de parasitosis (Tabla 1). Estas cifras lejos de disminuir con el transcurso de los años, muestran un comportamiento de persistencia o incremento de acuerdo al año anterior, de acuerdo a reportes emitidos por la Secretaria de Salubridad. Las enfermedades parasitarias en humanos se presentan en forma sub-aguda o crónica y aunque en algunas ocasiones se adquiere protección contra la reinfección, la respuesta inmune inducida es poco efectiva en la eliminación del parásito. Por esto, se requiere intensificar estudios tanto de biología del parásito como de los mecanismos inmunes y métodos de diagnóstico, prevención y control de estas parasitosis.

Tabla 1. Casos acumulados de algunas enfermedades parasitarias en México durante 1997 y 1998.

PARASITOSIS	No. CASOS 1997*	No. CASOS 1998*
Amibiasis intestinal	946221	10615058
Absceso hepático	5096	5194
Giardiosis	46374	49408
Oxyuriasis	87977	93126
Ascariosis	311703	336480
Taeniosis	2328	2504
Otras helmintosis	521877	484817
Otras debido a protozoarios	66566	79195
Cisticercosis	545	580

* Casos reportados a la semana 39 del año correspondiente

Tomado del reporte emitido por la SSA. (1998)

Uno de los parásitos de la especie helmintos más estudiados es *Trichinella spiralis*. En este caso, el contar con modelos animales a partir de los cuales se pueden obtener y estudiar las diferentes fases de desarrollo del parásito, ha contribuido de manera importante a facilitar el estudio de la biología del parásito.

1.1 TAXONOMIA

Trichinella spiralis fue descubierta en Inglaterra, en músculos de cadáveres humanos por Peacock en 1828. Leidy en 1860, encontró lo mismo en carne de cerdo. En 1991, la arqueoparasitología puso de manifiesto al parásito en momias americanas, lo que indica que esta parasitosis es más vieja de lo que se creía (Tomado de Alcantará y cols., 1992).

La clasificación del parásito fue realizada por Owen (1935), quien encontró y describió el agente etiológico *Trichinella*, el cual es un helminto que pertenece al phylum Nematoda en donde se encuentran agrupados otros organismos de importancia médica, como *Ascaris sp.*, *Onchocerca sp.* y *Trichuris sp.* Este parásito se clasifica en la Clase Adenoforea, Orden Enoplida y Familia Trichinellidae.

1.2 MORFOLOGIA

Los parásitos de la especie *T. spiralis* son organismos muy pequeños, los machos miden 1.4 y 1.6 mm de longitud por 40 μm de diámetro y las hembras de 3 a 4 mm de longitud por 60 μm de diámetro con la vulva cerca de la mitad del esticosoma. La hembra posee un sólo ovario localizado en la parte posterior y produce óvulos de aproximadamente 25 μm de diámetro, los cuales presentan sólo 3 cromosomas. Los machos tienen espermatozoides no flagelados y su número cromosómico puede ser de 2 ó 3, por lo que éste determina el sexo de la descendencia (Despommier, 1983) (Fig. 1).

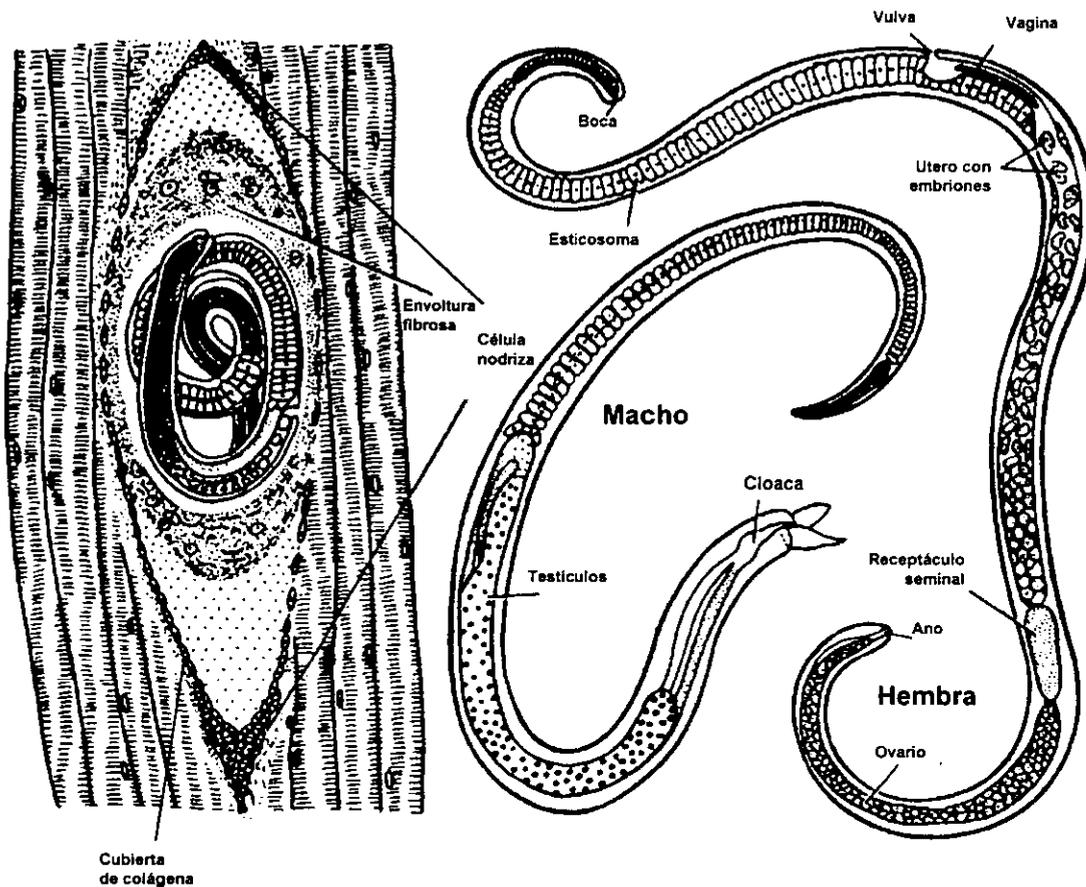


Figura 1. *Trichinella spiralis*: Larva muscular enquistada en el músculo y morfología de el macho y la hembra. Tomado de Silberstein and Despommier, (1985).

1.3 CICLO DE VIDA

Los parásitos del género *Trichinella* ocasionan una enfermedad conocida como trichinellosis, la cual afecta tanto al hombre como a muchos otros animales. En el caso del hombre, éste se infecta al consumir carne contaminada con larvas de una de las seis diferentes especies de *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli* y *T. britovi*) que se encuentran en el músculo estriado de los hospederos (Ancelle y cols., 1988; Dupouy-Camet y cols., 1994; Dupouy-Camet, 1997; Pozio y cols., 1997, 1998b; Pozio y La Rosa, 2000). El ciclo de vida de este parásito se inicia cuando las larvas llegan al intestino del hospedero y por acción de los jugos digestivos las larvas se liberan y sufren cuatro mudas hasta madurar a adulto e invaden inmediatamente la mucosa intestinal. Después de la copulación, la hembra expulsa a las larvas recién nacidas (LRN), que atraviesan la mucosa intestinal y por vía sanguínea o linfática entran en circulación a todo el organismo. Durante la migración muchas larvas son destruidas y solamente sobreviven aquellas que alcanzan los músculos estriados en donde maduran para convertirse en larvas musculares (LM) (Stewart, 1983) (Fig. 2). En este proceso, se presentan alteraciones en las células musculares, entre ellas la neovascularización, que dan lugar a la formación de lo que se ha denominado célula nodriza. Está última estructura mantiene al parásito por tiempo indefinido, almacenando nutrimentos para la misma célula y para la LM (Despommier y cols., 1991).

1.4 GENOTIPOS DE *Trichinella*

Estudios realizados por diferentes autores han demostrado que los parásitos del género *Trichinella* presentan una gran variabilidad genética (Pozio y cols., 1989; La Rosa y cols., 1992) la cual se refleja en la epidemiología, biología, hospederos, zoogeografía, patología y aspectos clínico de la enfermedad. En este contexto, Pozio y cols. (1992a,b), mediante un ensayo isoenzimático demostraron la presencia de 8 diferentes genotipos en 152 aislados originarios de 5 continentes y de diferentes hospederos. Con base en estos estudios y considerando distintas características biológicas (infectividad en ratas, infectividad en pájaros, desarrollo

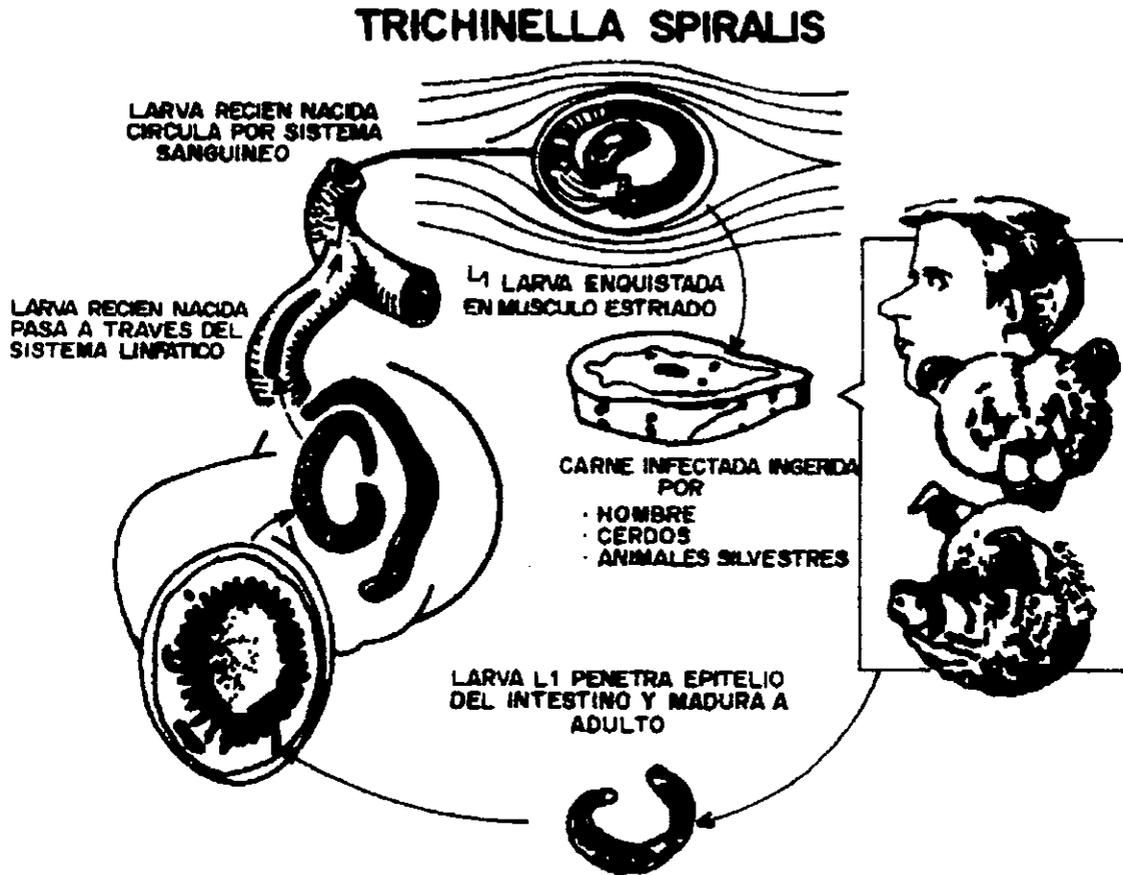


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Tomado de Murrell, (1985a).

de célula nodriza, fecundidad, resistencias al congelamiento e inducción de choque anafiláctico) los diferentes aislados se clasificaron inicialmente en 8 grupos (T1 a T8). Estos grupos también fueron identificados por su polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFPL) obtenidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Nagano y cols., 1999; Wu y cols., 1999), por la amplificación al azar del ADN (Acido Desoxiribonucleico) polimórfico (RAPD-PCR) (Bandi y cols., 1993a,b; Wu y cols., 1999) o secuencias del ADN complementario que codifican para glicoproteínas de excreción/secreción (E/S) (Wu y cols., 1998b), por PCR, utilizando iniciadores específicos (Appleyard y cols., 1999). La diferenciación de aislados de *Trichinella* se ha llevado a cabo por PCR (Dick y cols., 1992; Soulé y cols., 1993c) o por mapas peptídicos de productos de E/S de *Trichinella* (Wu y cols., 1998a).

Pozio y cols. (1992a,b) y La Rosa y cols. (1992) sugirieron que en base a los estudios isoenzimáticos y a distintas características biológicas, se reconozcan al menos cinco especies de *Trichinella*: *T. spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3), *T. pseudospiralis* (T4) y *T. nelsoni* (T7). Tres genotipos adicionales, nombrados T5, T6 y T8, fueron reconocidos en este género, pero su nivel taxonómico a nivel de especie fue incierto. Una gran parte de los aislados estudiados corresponden a *T. spiralis* s. e. (sentido estricto) (T1), los cuales fueron obtenidos de cerdos domésticos y cuya infectividad en ratas es muy alta, siendo esta una característica única de esta especie. Con respecto al genotipo T5, estudios recientes realizados con 32 aislados de animales selváticos de la región Neártica de América del Norte permitieron elevarla a nivel de especie ahora llamada *Trichinella murrelli*. Aunque esta especie es muy similar a *T. britovi* (se encuentra en la región Paleártica), difiere en el patrón de digestión de su ADN con dos enzimas de restricción (Hind III y Alu I), así como en el patrón obtenido por PCR-RFLP y en su distribución geográfica (Pozio y La Rosa, 2000).

Recientemente, Nagano y cols. (1999) realizaron un estudio para la identificación de aislados de *Trichinella* por PCR-RFLP del gen de la subunidad I del citocromo C oxidasa mitocondrial y sus resultados apoyan los 8 genotipos descritos de *Trichinella* anteriormente (Pozio y cols., 1992a,b; La Rosa y cols., 1992). Adicionalmente, los aislados obtenidos en Japón, que antes eran considerados *T.*

britovi, fueron propuestos como una nueva especie llamada *genotipo T9* debido a los resultados de este estudio y a los fragmentos de restricción obtenidos al digerir con Sspl, el gen de la proteína de E/S de 43 kDa (Wu y cols., 1999).

Pozio y cols. (1999a) describieron otra especie de *Trichinella*, *T. papuae* (T 10). Esta, fue aislada de cerdos domésticos y selváticos de Papua Nueva Guinea durante 1988 y 1998. Esta nueva especie no forma una cápsula y es un tercio más grande que la otra especie no encapsulada *T. pseudospiralis*.

1.5 SINTOMAS

Los síntomas de trichinellosis que se presentan más frecuentemente en humanos dependen del ciclo de vida del parásito. Así, cuando alcanza el estadio de adulto y se establece en la mucosa del intestino, se presentan reacciones inflamatorias, náuseas, diarrea y fiebre. Por otro lado, cuando las LRN pasan al torrente circulatorio se originan brotes febriles, edemas periorbitales y reacciones alérgicas. Cuando penetran las LRN al músculo esquelético se observan síntomas de toxicidad acompañados de mialgia (Ancelle y cols., 1988). Cabe señalar que los síntomas varían de acuerdo a la infección con las diferentes especies de *Trichinella* (Tabla 2) (Pozio y cols., 1993; Carneri y cols., 1988; Jongwutiwes y cols., 1998; Sacchini y cols., 1998). En casos de trichinellosis causadas por consumo de carne de puerco infectada con *T. spiralis*, la incidencia de complicaciones cardíacas, como la miocarditis (la cual muy comúnmente causa la muerte)(Andy y cols., 1977; Fourestie y cols., 1993; Ursell y cols., 1984) parece ser menor que la reportada por otros autores (Lazarevic y cols., 1999). *Trichinella spiralis*, ha sido la especie que más brotes ha causado por el consumo de carne de puerco contaminada. Sin embargo, recientemente se han reportado casos así como brotes de trichinellosis humana por consumo de carne de cerdo de animales silvestre, jabalí o de caballo contaminada con *T. spiralis*, *T. nativa* y *T. pseudospiralis* (Anón, 1998; Haeghebaert y cols., 1998; Jongwutiwes y cols., 1998; Wang y cols., 1998; Lazarevic y cols., 1999; Ranque y cols., 2000; Sohn y cols., 2000).

Tabla 2. Frecuencia de signos clínicos presentados en los tres brotes de trichinellosis humana ocurridos en Francia e Italia ocasionados por el consumo de carne de caballo.

Signos clínicos	Francia, Agosto 1985	Francia, Octubre 1985	Italia, Agosto 1986
	<i>T. 5*</i>	<i>T. spiralis</i>	<i>T. nelsoni**</i>
Mialgia	93%	88%	67%
Fiebre	90%	85%	70%
Urticaria	44%	11%	4%
Diarrea	50%	41%	21%
Dolor abdominal	43%	35%	26%
Edema facial	58%	84%	62%
Conjuntivitis	28%	34%	26%
Dolor de cabeza	58%	51%	66%

* Actualmente conocida como *T. murrelli* (Pozio y La Rosa, 2000).

** Reconocida como *T. britovi* (Tomado de Pozio y cols., 1988)

Tomado de Carneri y cols. (1988).

1.6 TRICHINELLOSIS EN MEXICO

En países de América del Norte, América del Sur, Asia y algunos países europeos se ha observado un incremento en el número de casos clínicos de trichinellosis (Wang y cols., 1998; Anón, 1998; Jongwutiwes y cols., 1998; Lanzarevic y cols., 1999; Moorhead y cols., 1999; Ortega-Pierres y cols., 2000; Pozio y cols., 1998b,c; Pozio, 2000; Sohn y cols., 2000). En particular, en México estudios realizados por Martínez-Marañón en 1983 y 1985 mostraron en varios estados de la República Mexicana un incremento en los brotes de trichinellosis humana. Así, en el estado de Zacatecas se reportó en un lapso de 7 años, 102 casos de trichinellosis y 158 casos en la recopilación de 10 años en el resto de la República Mexicana (Martínez-Marañón, 1985; Martínez-Marañón y cols., 1985).

En Zacatecas, existe el antecedente de que los brotes de trichinellosis han sido causados por la ingesta de carne de chorizo elaborada con carne de cerdo infectada con *T. spiralis*. En uno de los últimos brotes en este estado se demostró que la gente con un rango de edad de 15 a 44 años es el grupo más afectado. Las larvas se detectaron en 6 biopsias musculares (38 %) y en 6 casos por cortes histólogos e inmunoelectroforesis (Cabral-Soto y cols., 1990). Además, en 1992,

en Zacatecas, se examinaron 600 músculos de diafragmas de cerdos, observando que el 0.33 % resultaron positivos por el método de compresión directa y 1.33 % por el método de digestión artificial (Contreras y Herrera, 1992).

Por otro lado, Chihuahua también es considerado un estado endémico para trichinellosis. Uno de los últimos brotes documentados ocurrió en Ciudad Delicias, Chihuahua ocasionado por el consumo de derivados de cerdo. En esta ocasión se involucraron 166 personas y el 88.1 % presentaron resultados positivos por biopsia muscular y 90.3 % por el método de compresión y tinción tisular (Hernández y cols., 1992).

En México, se cree que la frecuencia de la trichinellosis puede ser mayor a lo reportado, ya que en muchos casos la enfermedad no es diagnosticada correctamente. Los estados donde con mayor frecuencia se han reportado brotes o casos de trichinellosis incluyen, Chihuahua, Estado de México, Jalisco, Zacatecas. También se han presentado casos de esta parasitosis en Durango, Distrito Federal, San Luis Potosí, Michoacán y Chiapas (Correa y cols., 1997).

Recientemente, De la Rosa y cols. (1998) investigaron la presencia de anticuerpos contra *T. spiralis* en Cerritos, San Luis Potosí y sus resultados sugieren que en este lugar, existe una trichinellosis humana endémica y la cual no ha sido notificada. Esta, se asoció al sexo femenino, a la ingestión de moronga y productos derivados de la carne de puerco.

Con respecto a la prevalencia de la trichinellosis porcina determinada por ELISA (Ensayo inmunoenzimático en placa sólida) utilizando antígenos de E/S y superficie/esticosoma (S/E) del extracto total de la LM de *T. spiralis*, indican que en Toluca, Edo. de México, Paso de Ovejas, Veracruz y Paracho, Michoacán, existe una prevalencia del 1 al 24% (Arriaga y cols., 1989). En otro estudio realizado por ELISA y digestión artificial en 50 cerdos de un rastro de Toluca, Estado de México, reveló un 6% de infección y un rango de entre 5 y 741 larvas por gramo (LPG) (Arriaga y cols., 1991).

En 1992 en un estudio en donde se analizaron 8000 cerdos en los Reyes la Paz, Estado de México, reveló un 1.25% de prevalencia por digestión artificial, pero por triquinoscopía se obtuvo un 6% de positividad (Vega-Alarcón y Romero, 1992). En el mismo año el Instituto de Salud en Toluca, Estado de México se analizaron por triquinoscopía 151 908 cerdos, pero en ninguno de ellos se determinó a la larva de *Trichinella*.

En un estudio llevado a cabo por Rodríguez-Macías, (1986) en un rastro en la ciudad de Puebla de mayo a agosto de 1995 reveló que de un total de 1500 cerdos no encontraron muestras positivas usando la digestión artificial. Estudios realizados en el estado de San Luis Potosí con muestras de suero de cerdo (995) revelaron que existe una prevalencia del 1.9 % (Padilla y cols., 1994).

En 1996, Luque-Hernández en 1200 cerdos sacrificados en Juchitepec, Estado de México, usando digestión artificial no reportó ninguna muestras positiva. Recientemente al analizar 539 cerdos usando la técnica de ELISA y antígenos del extracto total y antígenos TSL-1. En este estudio se observó una prevalencia de 13.9 y 11.7% (Monroy y cols., 2000). En un estudio reciente realizado en Zacatecas en 1999, (Moreno-García comunicación personal) en un total de 985 muestras de suero colectadas, 295 correspondían a cerdos provenientes de un rastro moderno y 700 cerdos de traspatio fueron analizados por Dot-ELISA. En este estudio 10 muestras de suero fueron positivas (Moreno-García comunicación personal). Por lo que, la falta de control en la crianza, introducción y sacrificio clandestino de cerdos favorece el desarrollo de la trichinellosis humana.

Correa y cols. (1997) sugirieron que la alta prevalencia de trichinellosis, determinada por la presencia del parásito y/o anticuerpos en el suero de varios animales (Arriaga y cols., 1991,1995a,b; Mazzoti y Alcántara, 1954; Murrell, 1994; Yépez-Mulía, 1996, 1999) sugieren que esta parasitosis es mucho más frecuente que lo esperado. Por lo que estudios posteriores podrían determinar la prevalencia real de esta infección.

1.7 METODOS DE DIAGNOSTICO

Debido a que la trichinellosis es una enfermedad que se adquiere por el consumo de carne, principalmente de cerdo, infectada con *Trichinella*, el control se basa en la detección de animales infectados, mediante la inspección en los rastros. En los rastros de países desarrollados, se realiza el diagnóstico de esta parasitosis mediante el método de digestión artificial. Sin embargo, en países considerados en vías de desarrollo, el método de inspección para la presencia de *Trichinella* en cerdo, es la observación visual de parásito *in situ* por la técnica de triquinoscopía. Esta técnica se realiza generalmente mediante la demostración directa de la LM en biopsias de músculos. Sin embargo, este método tiene limitaciones ya que el tamaño de la muestra es pequeño y restringe la detección de las larvas en el músculo de animales aún con cargas parasitarias altas. La triquinoscopía tiene una sensibilidad de detección de 3-10 LPG de carne analizada (Touratier, 1991) por lo que cerdos que tienen cargas parasitarias menores no se detectan.

En los países europeos, el diagnóstico de la infección se realiza mediante digestión artificial de una mezcla de muestras de 30 cerdos, tomando 10 g de cada uno (van Knapen y cols., 1981) y en Estados Unidos se realiza la determinación a partir de una mezcla de 20 animales de rastro tomando muestras individuales de un mínimo de 5 g (Internacional Committec of. the O.I.E., 1992).

Con respecto a la carne de cerdo y caballo, Gamble y cols. (1997) compararon la digestión artificial usando 1 ó 5 g de muestra, de varios tejidos de estos animales. En todos los casos con 1 g de muestra se detectaron infecciones > 3-5 LPG de tejido. Sin embargo, el uso de 5 g en la técnica de digestión artificial es más eficiente en detectar infecciones > 1 LPG. Asimismo, Forbes y Gajadhar, (1999) validaron la técnica de digestión artificial en carne de cerdo y de caballo, sugiriéndose que con 3-5 g de muestra es posible detectar una carga parasitaria de 1 a 1.9 LPG, pero que 5 g es óptimo tanto para carne de cerdo como de caballo.

Es importante mencionar que estos estudios se han realizado con muestras de tejido muscular de cerdos y caballos infectados experimentalmente con LM de *T.*

spiralis. Los estudios realizados con caballos de rastro infectados naturalmente con *Trichinella* han puesto en evidencia que en estos animales la carga parasitaria puede ser baja, requiriéndose digerir muestra de tejido muscular más grande entre 20 y 40 g, con la finalidad de detectar al parásito (Arriaga y cols., 1995b).

Por otro lado, un aspecto de gran importancia que afecta la sensibilidad del método de digestión artificial es la preparación de la muestra la cual varía entre los diferentes países que la emplean (Zimmerman, 1983). Así, Gamble, (1999) investigó algunos de los factores que afectan la eficiencia en la digestión de carne de cerdo y de caballo, observando que no existe diferencia cuando la carne se mezcla o se tritura y posteriormente se hace la digestión artificial. También observaron que el incremento en la concentración de pepsina mejora la digestión ligeramente. Sin embargo, el factor más crítico que afecta la recuperación de la larva es el tamaño del poro del tamiz que se usa, por lo cual, ellos recomiendan el uso de un tamaño de poro de 355 µm para garantizar la recuperación óptima de las larvas.

1.8 DIAGNOSTICO SEROLOGICO

Con la finalidad de incrementar la sensibilidad del diagnóstico de trichinellosis, se han empleado diferentes métodos serológicos tales como: hemaglutinación en látex, inmunofluorescencia y ELISA en el diagnóstico de trichinellosis porcina (van Knapen y cols., 1981, 1984; Murrell y cols., 1986). De éstos, el ensayo de ELISA permite un diagnóstico sensible de la trichinellosis, sin embargo, el empleo de extracto total de *T. spiralis* en el ELISA ocasiona reacciones cruzadas lo cual se puede evitar mediante el empleo de antígenos purificados del parásito (Gamble y cols., 1983). Así, Gamble y cols. (1983) y Murrell, (1985b) utilizaron antígenos de E/S de la LM de *T. spiralis* en el ELISA, aumentando tanto la sensibilidad del ensayo (93 %) como una especificidad del 92%.

Por otro lado, Arriaga y cols. (1989) evaluaron tanto extracto total como antígenos de S/E purificados y productos de E/S de la LM de *T. spiralis* en el diagnóstico de la trichinellosis porcina mediante ELISA. Los autores demostraron que al utilizar en este ensayo antígenos purificados del parásito (S/E y E/S) se incrementa la

especificidad del ELISA, disminuyendo de esta forma las reacciones inespecíficas (Fig. 3)

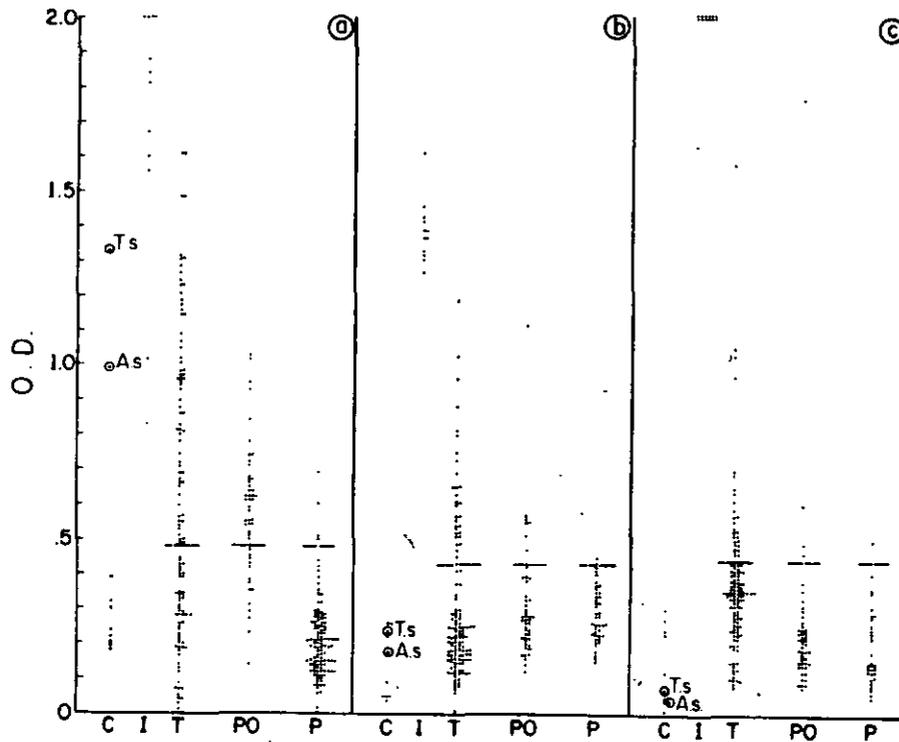


Figura 3. Valores de densidad óptica (O.D.) de sueros de cerdos de traspatio obtenidos en ensayos de ELISA con a) el extracto crudo, b) los antígenos de superficie/esticosoma purificados o c) los antígenos de excreción/secretión de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. Como testigos se utilizaron sueros de cerdos no infectados (C) y sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* (I), *A. suum* (A.s.) o *T. suis* (T.s.). Los cerdos de traspatio provenían de Toluca, Estado de México, (T), Paso de Ovejas, Veracruz (PO) y Paracho, Michoacán (P). Tomado de Arriaga y cols. (1989).

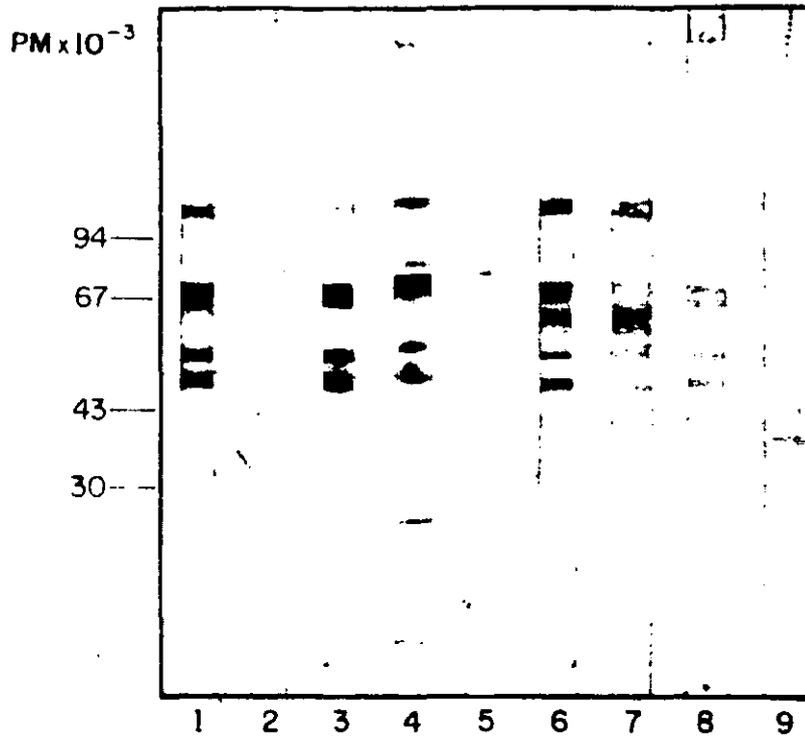


Figura 4. Antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* reconocidos por inmunoelectrotransferencia por sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. (1) Suero de cerdo infectado experimentalmente. (2) Suero de cerdo testigo infectado. (3-4) Sueros de cerdos positivos en digestión artificial y en ELISA con los antígenos purificados de superficie/esticosoma. (5-9) Sueros de cerdos negativos en digestión artificial y en ELISA. (6-8) Sueros de cerdos negativos en digestión artificial y positivos en ELISA con los antígenos purificados de superficie/esticosoma. Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Arriaga y cols. (1994).

En este estudio, se determinaron mediante inmunoelectrotransferencia (IET) los principales componentes de la LM de *T. spiralis* que son reconocidos por cerdos infectados experimentalmente con el parásito (Fig. 4). Así, se determinó que los sueros de estos animales reconocen cinco proteínas con un peso molecular de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa, las cuales son similares a lo reportado para los componentes de S/E purificados con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (Ortega-Pierres y cols., 1989). Aunado a esto, los autores demostraron que estos antígenos de S/E, fueron reconocidos por sueros de cerdos de traspatio infectados con *Trichinella*. Estos antígenos también pueden ser utilizados como un antígeno común para estudios de diagnóstico y epidemiología en cerdos domésticos y selváticos, pues al infectar experimentalmente a cerdos domésticos con seis diferentes especies de *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli* y *T. nelsoni*) se pudo detectar la presencia de anticuerpos de cualquier especie de *Trichinella* por los seis diferentes antígenos de E/S del parásito (Kapel y Gamble, 2000).

En cuanto al diagnóstico de trichinellosis humana, se han publicado métodos para la búsqueda de antígenos circulantes y de anticuerpos específicos contra el parásito en pacientes con la enfermedad (Tomado de Alcántara y cols., 1992). En un estudio realizado con pacientes probables y confirmados a la exposición al parásito, empleando técnicas de radioinmunoensayo e inmunofluorescencia indirecta, se encontró que el 100% pacientes confirmados y el 46% de los probables presentaban anticuerpos específicos contra antígenos de E/S, mientras que el 47 y 13% respectivamente, presentaban antígenos circulantes. Estos resultados demostraron que la determinación de antígenos es menos sensible que la búsqueda de anticuerpos (Tomado de Alcántara y cols., 1992).

Por otro lado, la utilización del ELISA y los antígenos de S/E del parásito permitió detectar anticuerpos en individuos en un brote de trichinellosis en Toluca, los anticuerpos se detectaron a la 3a, 5a, 7a, 15a y 57a semanas post infección (pi) y

los porcentajes de positividad fueron de 25, 94, 100, 100 y 57 respectivamente (Salinas-Tobón y cols, 1994a,b). Por otro lado, durante 19 brotes de trichinellosis humana que involucraron a 367 personas en la República Mexicana se obtuvo por ELISA una positividad del 44 %. En cuanto al patrón de reconocimiento antigénico en humanos, este es similar al reconocido por ratones y cerdos y la respuesta humoral está dirigida principalmente contra componentes de S/E, aunque también se reconocen productos de E/S de la LM de *T. spiralis* (Fig. 5) (Salinas-Tobón y cols., 1994c).

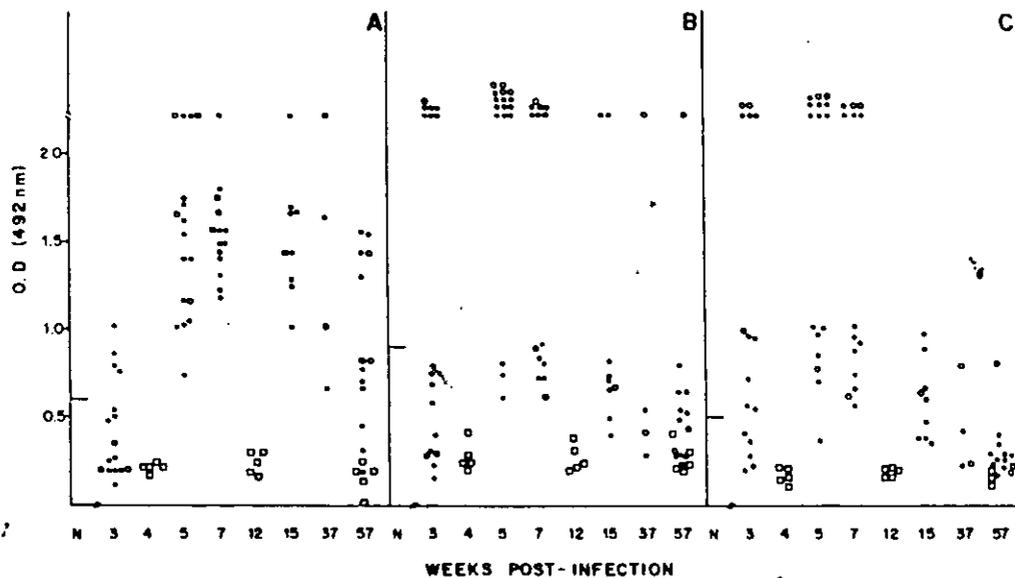


Figura 5. Valores de densidad óptica (O.D.) de sueros de pacientes involucrados en un brote de trichinellosis humana usando preparaciones antigénicas de los tres estadios de *Trichinella spiralis*, a) larva muscular, b) adulto o c) larva recién nacida. Las muestras de suero probadas de pacientes con biopsias positivas (+) o negativas (-) y de individuos asintomáticos (.). La línea continua indica el punto de corte. Tomado de Salinas-Tobón y cols. (1994c).

En un Taller Internacional de trichinellosis realizado en Bilthoven, Holanda (Agosto de 1990) se probó la reactividad de diferentes anticuerpos monoclonales y policlonales hacia diferentes preparaciones antigénicas de los diferentes estadios de *T. spiralis* (incluyendo los antígenos de S/E y E/S) empleando IET, ELISA e inmunoprecipitación. La mayor parte de los anticuerpos probados reconocieron moléculas con peso molecular entre 51 y 105 kDa y se propuso clasificar a estas moléculas dentro del grupo de antígenos TSL-1. Los componentes de S/E y los de E/S quedaron incluidos en este grupo (Appleton y cols., 1991; Ortega-Pierres y cols., 1996). Estudios posteriores determinaron que el carbohidrato tivelosa es el epítipo responsable de su inmunodominancia, además de ser específico del género *Trichinella* (Wisnewski y cols., 1993). Basado en estos resultados, Wassom y cols. (1994) han sugerido el uso de la tivelosa en el diagnóstico de trichinellosis.

2. ANTECEDENTES

La carne de cerdo ha sido considerada la principal fuente de infección de *Trichinella* para el humano. Sin embargo, se han reportado brotes causados por carne de otros animales como el oso, morsa, jabalí, camello y caballo (Ramisz, 1985, 1988; Pozio y cols., 1993, 1998a; van Knapen y Franchimont, 1988; Bourée y cols., 1988; Ancelle y cols., 1985, 1986, 1988, 1998; Dupouy-Camet y cols., 1994; Haeghebaert y cols., 1998; Anón, 1998).

Los brotes de trichinellosis humana más importantes ocurridos en Europa en los últimos años, han sido atribuidos al consumo de carne de caballo infectada con el parásito. En la Tabla 3, se resumen los brotes de trichinellosis humana ocurridos en Francia e Italia desde 1975 a 1998. Estos brotes han involucrado a más de 3000 personas y han causado 5 decesos. Se han identificado distintas especies de *Trichinella* asociadas a los brotes ocurridos en estos países: *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. murrelli*. Cabe resaltar que *T. spiralis* ha sido la especie responsable de la mayoría de estos brotes.

La principal pregunta acerca de como la carne de caballo se relaciona con los brotes va ligada al modo de infección de los caballos, al control veterinario y a los hábitos de consumo. Así, la vía natural por la cual un animal herbívoro como el caballo adquiere la infección con *Trichinella* se desconoce, sin embargo existen evidencias que indican que ésta puede ser a través del alimento contaminado con carne infectada con el parásito (Dupouy-Camet y cols., 1994; Dupouy-Camet, 1997). Como resultado de los brotes de trichinellosis humana relacionados con el consumo de carne de caballo se han llevado a cabo infecciones experimentales para estudiar si el caballo es una fuente de infección para el humano y desarrollar métodos de diagnóstico más sensibles. En estos estudios se ha demostrado que es posible infectar experimentalmente a caballos con varias especies de *Trichinella* (*T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. spiralis*) y que *T. spiralis* es la especie con mayor adaptación en el caballo (Smith y Snowdon, 1987; Polidori y cols., 1988; Soulé y cols., 1988, 1989, 1993a; Gamble y cols., 1996; Voigt y cols., 1997; Yépez y cols., 1999).

Tabla 3. Brotes de trichinellosis humana ocurridos en Italia y Francia de 1975 a 1998, ocasionados por el consumo de carne de caballo.

Año	Lugar	No. de Casos (muertos)	Origen Del caballo	Especie de <i>Trichinella</i>
1975 ^a	Bagnolo in Piano, Italia	89	Ex Yugoslavia	<i>T. britovi</i>
1975 ^b	Chatenay-Malabry, Francia	125	Europa del este	--
1984 ^c	Varese, Italia	13	Ex Yugoslavia	--
1985 ^d	Paris y Melun, Francia	431(2)	Connecticut, EUA	<i>T. 5*</i>
1985 ^e	Paris y 10 focos en Francia	642(3)	Europa del este (Polonia?)	<i>T. spiralis</i>
1986 ^f	Salsomaggiore, Italia	>300	Ex Yugoslavia	<i>T. britovi</i>
1990 ^g	Bartetta, Italia	>500	Europa del este	<i>T. spiralis</i>
1991 ^h	Clermont-Ferrand, Francia	23	EUA	--
1993 ⁱ	Paris, La Rochelle y 2 focos en Francia	538	Canadá	<i>T. spiralis</i>
1994 ^j	Provincias, Francia	7	México	<i>T. spiralis</i>
1998 ^k	Piacenza, Italia	92	Polonia	<i>T. spiralis</i>
1998 ^l	Francia	100	Europa del este	<i>T. spiralis</i>
1998 ^m	Toulouse, Francia	404	Ex Yugoslavia (Bosnia)	<i>T. spiralis</i>

^{a,j} Tomado de Dupouy-Camet, (1997).

^h Laurichesse y cols. (1997).

^k Pozio y cols. (1998a).

^l Haeghebaert y cols. (1998).

^m Anón, (1998).

*T5, recientemente identificada como *T. murrelli*

Los brotes de trichinellosis humana ocasionados por el consumo de carne de caballo, sólo se han reportado en Francia e Italia, países donde cerca del 30% de la población generalmente consume carne de caballo cruda o semicocida como: carne tártara o carpaccio (Pozio y cols., 1997). Aunque, en los brotes ocurridos de 1975 a 1994, no se demostró la presencia del parásito en la carne de estos animales, el seguimiento epidemiológico realizado por las autoridades sanitarias de los países afectados (Francia e Italia), demostraron que los brotes habían sido causados por el consumo de carne de caballo. A partir de biopsias tomadas de individuos y animales domésticos infectados en estos brotes se realizó la identificación de las especies de *Trichinella* mediante técnicas moleculares (Dupouy-Camet y cols., 1994). Recientemente, Pozio y La Rosa (2000) analizaron muestras de músculo de un cadáver humano, el cual consumió carne durante el primer brote de 1985 en Francia, identificándose larvas de *Trichinella* pertenecientes al genotipo T5, ahora llamado *T. murrelli*.

Recientemente se ha detectado la presencia del parásito en la carne de caballo. Esto confirmó que la especie de *Trichinella* que ocasionó los brotes en Francia e Italia en 1998, fue *T. spiralis* (Anón, 1998; Haeghebaert y cols., 1998).

Debido a los dos brotes de trichinellosis ocurridos en Francia en 1985, que involucraron a más de 1000 personas, la Comunidad Económica Europea estableció en 1985 de manera obligatoria la inspección de los canales de caballo para consumo humano mediante los exámenes de triquinoscopía o digestión artificial. Estos procedimientos definidos por las regulaciones internacionales de la Comunidad Económica Europea (77/96/EEC, 84/319/EEC, 89/321/EEC), especifican que la cantidad de carne requerida es de 1 g por cerdo, en una mezcla de 100 g. Debido a que se presentaron más brotes de trichinellosis, la misma Comunidad Europea en 1994, propuso analizar por digestión artificial 5 g de muestra de cada canal en lugar de 1 g, como anteriormente se realizaba (94/60/EC). Así, se adoptó la inspección de carne de caballo, no sólo en los países donde se han descrito los brotes sino también en países exportadores de carne de caballo como los países del este de Europa y México (Ramisz y Balicka, 1994).

Sin embargo, a pesar de estas regulaciones se han seguido presentado brotes de trichinellosis, como los ocurridos en Piacenza, Italia y Toulouse, Francia durante enero y marzo de 1998 respectivamente, que involucraron a más cerca de 600 personas (Anón, 1998; Haeghebaert y cols., 1998).

Lo anterior, pudiera deberse a que la detección de larvas de *Trichinella* en muestras de carne de caballo de rastro por triquinoscopía y digestión artificial tiene baja sensibilidad, aunado a la poca cantidad de carne que se utiliza para este análisis (Ruitenbergh y cols., 1983). Por otro lado, la carga parasitaria en infecciones en los caballos es baja, lo cual contribuye a la baja detección del parásito mediante estos métodos (Soulé y cols., 1989, 1993a; Yépez y cols., 1999).

De hecho, en muchos países se han examinado millones de muestras de carne de caballo utilizando las técnicas de rutina y sólo cuando se utilizan cantidades muy grandes de tejido 35 g (Boni y cols., 1989) 22-40 (Arriaga y cols., 1995b) 100 g

(citado por Pozio y cols., 1997) y 5 g (Pozio y cols., 1997) se han encontrado larvas de *Trichinella* en diferentes músculos. Existe un reporte de la detección de la LM de *Trichinella* en caballos provenientes de un rastro de México. Este estudio fue realizado en el Rastro Rural "5 de Junio" de San Vicente Chicoloapán del Estado de México, demostrándose la presencia de la LM de *Trichinella* en 4/80 (5%) muestras de diafragma (22-40 g) analizadas por digestión artificial. Las LM fueron identificadas por PCR como *T. spiralis* (Arriaga y cols., 1995b). Cabe mencionar que este es el primer reporte convincente de caballos infectados naturalmente en donde se determinó la especie de *Trichinella*. Posteriormente en 1996, se detectaron LM en 100 g de lengua de caballos importados de Polonia. La identificación de las LM se realizó en Bordeaux, Francia (citado por Pozio y cols., 1998a) como pertenecientes a *T. spiralis*. En el mismo año, los servicios veterinarios de Italia, al analizar 5 g de diafragma, documentaron la detección de un caballo infectado naturalmente, de un lote de 28 animales que provenían de Rumania (Pozio y cols., 1997). Posteriormente, en enero y abril de 1998, se hizo la detección durante un examen de rutina en Italia, de dos caballos infectados naturalmente, importados de Polonia y Yugoslavia, respectivamente (Pozio y cols., 1998b, 1999b). La cabeza del caballo importado de Polonia, por error salió al mercado y causó un brote (92 personas) en Italia (Haeghebaert y cols., 1998). El último reporte de un brote, por trichinellosis equina fue hecho en Francia por Anón, (1998), en donde la detección de la LM de *Trichinella spiralis* se hizo después de que la ingestión de la carne afectó a 404 personas.

Hasta la fecha se han identificado 12 caballos de rastro infectados naturalmente con *Trichinella* (Tabla 4). Las LM de 6 de estos caballos, se obtuvieron por digestión artificial y fueron identificadas a nivel de especie, como *T. spiralis*. Por otro lado, los últimos 3 caballos infectados naturalmente (excepto el último) provenían de un área localizada a 30 Km de Vukovar (Ex-Yugoslavia), en donde más del 50% de los cerdos están infectados (Marinculic, I. comunicación personal). En esta área, durante el período de engorda el manejo de los caballos es inadecuado, lo cual pudo resultar en la infección con *Trichinella*.

Tabla 4. Detección de la larva muscular de *Trichinella* en caballos de rastro, infectados naturalmente con el parásito.

Año	LPG DIA	LPG LENGUA	LOCALIDAD Y PAIS	ORIGEN DEL CABALLO	ESPECIE DE <i>Trichinella</i>
1989 ^a	0.26	nd	Brescia, Italia	Ex-Yugoslavia	ni
1994 ^b	1.8 1.6 1.0 0.8	nd nd nd nd	Estado De México	México	<i>T. spiralis</i> ni ni <i>T. spiralis</i>
1996 ^c	nd nd	0.01% 0.02%	Bourdeaux, Francia	Polonia	ni ni
1996 ^d	3.1	11	Barletta, Italia	Rumania	<i>T. spiralis</i>
1998 ^e	256.0	1749	Brescia, Italia	Polonia	<i>T. spiralis</i>
1998 ^f	166.0	615	Poggio, Imperiale	Ex-Yugoslavia	<i>T. spiralis</i>
1998 ^g	9 - 27	nd	Toulouse, Francia	Bosnia, Ex-Yugoslavia	<i>T. spiralis</i>

^a Boni y cols. (1989).

^b Arriaga y cols. (1995b).

^c Tomado de Pozio y cols. (1998a).

^d Pozio y cols. (1997).

^e Haeghebaert y cols. (1998).

^f Pozio y cols. (1999b).

^g Anón, (1998).

ni: no identificado

nd: no determinada

Un aspecto de gran importancia que puede contribuir a que no se detecten de manera rutinaria caballos infectados naturalmente con *Trichinella*, es que la digestión artificial se realiza con músculos que no son aquellos en los que preferentemente se localiza el parásito.

Varios autores han realizado infecciones experimentales en caballos para determinar cuales son los músculos más infectados. Así, Smith y Snowdon, (1987) infectaron 3 ponies con 1 000, 5 000 y 25 000 LM de *Trichinella spiralis* y observaron que la lengua, macetero y diafragma fueron los músculos con mayor cantidad de LM. Los mismos resultados fueron obtenidos en caballos infectados con 10 000 LM (Polidori y cols., 1988). Asimismo, Soulé y cols. (1989) detectaron un gran número de LM en la lengua, con respecto al macetero, en 5 de 8 animales infectados con 5 000, 20 000 y 50 000 LM de *T. spiralis*. En uno de los tres caballos restantes, el macetero tenía más LPG que la lengua y en los otros dos

caballos, el diafragma tenía más LPG que la lengua y el macetero. Por otro lado, Polidori y cols. (1990) también encontraron que en la lengua hay un mayor número de LPG en un caballo infectado con 10 000 LM de *T. spiralis*. Posteriormente, Gamble y cols. (1996) examinaron 15 diferentes músculos de caballos infectados experimentalmente con 10 000 y 40 000 LM y observaron un gran número de LM en el macetero, comparado con la lengua, mientras que animales infectados con sólo 1 000 o 4 000 larvas, la lengua contenía mayor número de larvas. Los mismos datos se obtuvieron con 7 caballos infectados con 20 000 LM (Soulé y cols., 1993a). Por lo que se puede concluir que en caballos con dosis infectivas bajas, la lengua es el sitio preferente de la LM seguido por el macetero y el diafragma (Gamble y cols., 1996). Un gran número de LPG en la lengua, comparado con el macetero, fue reportado por Voigt y cols. (1997), en 7 caballos que recibieron una dosis infectiva de 5 000 LM. Recientemente Yépez y cols. (1999) infectaron 3 caballos con 30 000 y 40 000 LM de *T. spiralis*, observando que la lengua, fue el sitio más infectado seguido por el diafragma y macetero (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de los músculos de caballos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* con diferentes dosis infectivas.

Referencia	a	a	b	c	d	d	e	e
Dosis	20 000	20 0000	10 000	10 0000	5 000	5 000	40 000	40 000
Semana pi	7	20	35	12	12-15	17-20	27	27
Músculo	Larvas/gramo							
Lengua	39.5	3.80	15.2	19.5	5.45	0.55	14.8	0.67
Macetero	61.2	0.23	13.3	21.9	6.37	0.31	0.29	0.42
Diafragma	28.8	6.02	10.5	5.9	2.30	0.43	16.4	nd

a) Soulé y cols. (1989)

b) Polidori y cols. (1990)

c) Gamble y cols. (1996)

d) Voigt y cols. (1997)

e) Yépez y cols. (1999).

nd: no se detectaron

En 3 caballos infectados naturalmente con *T. spiralis* (Tabla 5), Pozio y cols. (1999b) reportaron los sitios predilectos de infección. Los músculos que se encontró que tenían un mayor número de LPG fueron los de la cabeza: el músculo bucinator (12, 1183 y 411 LPG) en la lengua (11, 615 y 1749 LPG) y el macetero (4.9, 289 y 821 LPG). El diafragma de estos caballos ocupó del 6° al 15° lugar en número de LPG (3.1, 166 y 256 LPG). Por lo anterior, los autores sugieren que se utilicen los músculos de la cabeza para el diagnóstico de la trichinellosis equina.

Considerando la baja sensibilidad hasta ahora reportada para los métodos parasitológicos (triquinoscopía y digestión artificial) en el diagnóstico de la trichinellosis equina, diferentes investigadores han empleado el ELISA para la detección de anticuerpos con la finalidad de determinar si este método de diagnóstico es específico y más sensible que los parasitológicos.

Para esto, se han realizado infecciones experimentales en caballos empleando diferente número de larvas. Así, Smith y Snowdon, (1987) reportaron una infección experimental en 2 ponies con una dosis de 5 000 y 25 000 LM de *T. spiralis*, observándose que tenían valores de densidad óptica positiva a los días 26 y 24 pi respectivamente. Por otro lado, Polidori y cols. (1988) reportaron en un caballo infectado experimentalmente con 10 000 LM de *T. spiralis*, un incremento en los niveles de anticuerpos contra el parásito entre la 4a y 8a semana pi evidenciándose un decremento a la 12a semana.

En caballos infectados con 20 000 LM de *T. spiralis* se demostró la presencia de anticuerpos contra el parásito a partir de la 4a semana (Soulé y cols., 1989), observándose una disminución en los niveles de anticuerpos a partir de la 12a semana pi. Cabe señalar que Soulé y cols. (1993a,b) al realizar una reinfección con la misma dosis inicial (20 000 LM de *T. spiralis*), observaron que el caballo eliminó más rápidamente las LM, alcanzándose un pico en el nivel de anticuerpos al día 42 pi. Posteriormente, Yépez y cols. (1999) realizaron una infección experimental en 2 caballos con 40 000 y un caballos con 30 000 LM de *T. spiralis* observando que a la 3a semana hubo un incremento en el título de anticuerpos y el mayor título se observó entre la 10a y 15a semana pi, decreciendo rápidamente y manteniéndose bajo hasta la semana 27a pi.

En relación con los estudios serológicos realizados con caballos provenientes de rastro, diferentes autores (Battelli y cols., 1994; van Knapen y Franchimont. 1988; Virga y cols., 1994; Yépez y cols., 1999) indican que serológicamente es posible detectar anticuerpos dirigidos contra *Trichinella* en sueros de estos animales, siendo alto el porcentaje de animales seropositivos (1.6 a 7 %).

A este respecto, Virga y cols. (1994) analizaron la presencia de *Trichinella* en 256 caballos de rastro (tomando 10 g del macetero) por digestión artificial y por métodos serológicos utilizando como antígeno un extracto crudo de la LM. Mediante digestión artificial no se detectaron muestras positivas, mientras que por ELISA 4 caballos fueron positivos (1.6 %). Uno de ellos no tenía helmintos intestinales, mientras que los otros tres tenían diferentes parásitos intestinales como: *Strongilus edentatus*, *Strongilus vulgaris*, *Trichonema sp*, *Triodontophorus sp*, *Trichostrongylus axei* y *Parascaris equorum*, por lo cual los autores sugieren que no existe reactividad cruzada entre *Trichinella* y estos parásitos intestinales.

Por otro lado, Ramisz y Balicka, (1994) analizaron en Polonia, que es un área endémica de trichinellosis, por ensayos parasitológicos y serológicos la existencia de caballos infectados con *T. spiralis* utilizando un extracto total del parásito. Así, se examinaron 13 523 muestras por digestión artificial, resultando negativas; sin embargo, de 1119 sueros de caballos examinados por ELISA empleando el extracto total del parásito seis muestras fueron positivas (0.53 %). Los sueros probados tuvieron un título de anticuerpos entre 1:20 y 1:40.

En México, en un estudio realizado en el rastro "5 de Junio" de San Vicente Chicoloapan, del Estado de México se analizaron 80 muestras de diafragma de caballos sacrificados en este rastro por digestión artificial y en 4 de ellas se encontraron LM de *Trichinella* identificadas por PCR como *Trichinella spiralis* (Arriaga y cols., 1995b). Por ELISA se analizaron los sueros de los 80 caballos de rastro, empleando productos de e/s de la LM de *T. spiralis* obteniéndose una positividad del 7 %. De los cuatro caballos infectados naturalmente, sólo uno resultó positivo, a una dilución 1:20, siendo los otros falsos negativos (Yépez y cols., 1999). En este ensayo se detectaron niveles muy bajos de anticuerpos, lo cual está de acuerdo con lo demostrado por Soulé y cols. (1989,1993a,b). Las

muestras de sueros de los caballos de rastro positivas por ELISA, se analizaron por IET la mayoría de ellos reaccionaron con componentes de la LM de *T. spiralis* (Yépez-Mulia y cols., 1999). Un patrón de reconocimiento similar se obtuvo con sueros de caballos infectados experimentalmente (Perret y cols., 1997; Yépez-Mulia y cols., 1999).

Por ELISA se ha demostrado que los anticuerpos en caballos no se detectan cerca de los 6 meses después de la infección experimental (Soulé y cols., 1989; Yépez y cols., 1999) en tanto que cuando se empleó la técnica de IET, utilizando antígeno total de la LM de *T. spiralis* y sueros de caballos infectados experimentalmente con el parásito, se ha demostrado que estos sueros reconocen componentes de los antígenos TSL-1 principalmente entre la 5a y 16a semana pi (Perret y cols., 1997; Yépez y cols., 1999). Con respecto a los caballos infectados naturalmente, este análisis no ha sido útil en detectar anticuerpos contra *Trichinella* en los caballos (Pozio y cols., 1997; Yépez y cols., 1999) aunque LM presentes en los músculos de los caballos todavía sean infectivos (Arriaga y cols., 1997; Pozio y cols., 1997).

Considerando las evidencias serológicas relacionadas con los niveles bajos de anticuerpos en caballos de rastros, aunada a que en caballos infectados experimentalmente se ha demostrado que en una infección temprana y/o tardía, los niveles de anticuerpos son bajos, es claro que los ensayos serológicos no permiten el diagnóstico adecuado de la trichinellosis equina.

A este respecto, existen evidencias que indican que la amplificación del ADN del parásito por PCR, constituye una alternativa para el diagnóstico sensible y específico de la trichinellosis. Así, Dupouy-Camet y cols. (1991) demostraron que es posible amplificar el ADN de *Trichinella spiralis* directamente a partir de músculos de animales infectados, no interfiriendo en el ensayo el ADN del hospedero. Los autores utilizaron iniciadores complementarios a la secuencia repetida de 1.6 Kb de *T. spiralis* presente en la clona pPra (deVos y cols., 1988) obteniéndose productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb y uno de 200 pb no específico.

Para el diagnóstico de trichinellosis porcina, Dick y cols. (1992) emplearon los mismos iniciadores complementarios a la secuencia repetida de 1.6 Kb, con la finalidad de identificar mediante PCR aislados de *T. spiralis* provenientes de muestras de músculos de cerdos infectados experimentalmente con la LM del parásito. En este estudio, se obtuvieron los productos específicos esperados, detectándose desde 1 larva en el tejido muscular de cerdos, además no se detectó amplificación de esta secuencia cuando se empleó el ADN de *T. nativa*, siendo entonces específica para aislados porcinos.

Posteriormente, Soulé y cols. (1994) evaluaron el empleo mediante PCR en el diagnóstico de trichinellosis equina. En este estudio se colectaron muestras de sangre de caballos infectados experimentalmente a diferentes días pi, de las cuales se obtuvo el ADN y se amplificó por PCR utilizando los iniciadores complementarios a la secuencia repetida del fragmento de 1.6 kb. A partir del día 6 y hasta el día 14 pi se observaron los productos de amplificación específicos (600 y 800 pb). Después se presenta la amplificación alternada de estos productos hasta el día 33 pi, lo cual se puede deber a un decremento en el número de LRN a partir del día 14 pi. Considerando que el empleo de esta técnica permite la detección de la LRN en sangre, se sugiere que este sea un método adecuado para realizar la identificación temprana del parásito.

Además, UparanuKraw y Morakote, (1997) detectaron por PCR la presencia de la LRN de *T. spiralis* en sueros de ratones infectados experimentalmente utilizando los iniciadores pPra. El mismo patrón de productos de amplificación se obtuvo cuando se usó el ADN de sangre de ratón no infectado con el parásito, adicionada con LRN que al usar el ADN de la LRN.

Por otro lado, la identificación de la especie de *Trichinella* en caballos infectados naturalmente (Arriaga y cols., 1995b; Pozio y cols., 1997), se ha hecho mediante PCR utilizando dos pares de iniciadores: SB4-2 descritos por Wu y cols. (1997) y oTsr1 y oTsr-4 descritos por Zarlenga y Dame (1992).

Recientemente, Zarlenga y cols. (1999) desarrollaron una PCR multiplex para diferenciar inequívocamente todos los genotipos de *Trichinella*. Los iniciadores

fueron diseñados a partir de la región 5 del segmento de expresión del ADN ribosomal proveniente de 5 especies y 2 genotipos (*T5* y *T6*). Se diseñaron 5 iniciadores, los cuales fueron utilizados en un ensayo de PCR y se obtuvo un único patrón de bandeo para cada una de las especies y genotipos incluyendo tres diferentes genotipos de *T. pseudospiralis* (Zarlenga y cols., 1996, 1999).

3. JUSTIFICACION

En México, no se ha considerado hasta ahora la carne de caballo como posible fuente de transmisión de la trichinellosis al hombre y quizá debido a esto la inspección de la carne de caballo para detectar larvas de *Trichinella* mediante digestión artificial o triquinoscopía, sólo se lleva a cabo en los rastros Tipo Inspección Federal (TIF) en donde se procesa la carne que se exporta a Europa y Japón. Estos rastros funcionan bajo principios sanitarios internacionales y son supervisados periódicamente por representantes de los países compradores. De acuerdo con los reportes sanitarios de estos rastros, hasta ahora no se ha detectado, con los métodos empleados (digestión artificial o triquinoscopía) la infección de caballos con parásitos del género *Trichinella*. Por otro lado, en los otros rastros (tipo rural) donde se sacrifican caballos cuya carne es destinada a la alimentación de animales (domésticos o en cautiverio), los requisitos de higiene son menos estrictos y hasta donde se ha podido obtener información no se realiza ningún examen para establecer la presencia del parásito. Sin embargo, se calcula que una parte importante (35%) de esta producción es consumida por la población humana, la mayoría de los casos como adulterante de longanizas, chorizos y carne para hamburguesas. La detección de *Trichinella* por digestión artificial ha sido posible solamente cuando el tamaño de la muestra es grande. Por lo que, resulta un método de diagnóstico poco sensible, además de laborioso y costoso.

La utilización de métodos serológicos (ELISA e IET) tampoco ha resultado ser lo suficientemente sensible principalmente en infecciones tempranas y/o tardías, en donde los niveles de anticuerpos contra *Trichinella* son bajos. Una alternativa en el diagnóstico de la trichinellosis equina es el empleo de técnicas moleculares como la PCR, que permitan la detección del ADN del parásito.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso potencial del método de PCR en el diagnóstico de trichinellosis equina en dos rastros de la República Mexicana, uno Tipo Inspección Federal y otro rastro rural.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar el método de PCR para la detección del ADN de la larva muscular de *Trichinella spiralis* empleando muestras de tejido muscular de caballos infectados experimentalmente con el parásito o tejido de caballos normales a los cuales se adicionará un número determinado de larvas.

Evaluar el método de PCR en el diagnóstico de trichinellosis equina empleando muestras de tejido muscular de caballos de distintos rastros de México, las cuales se examinarán de manera paralela por digestión artificial y ELISA.

Analizar los resultados obtenidos por PCR, digestión artificial y ELISA en muestras de tejido muscular y de suero colectados de los caballos de rastro.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 PARASITOS

En este estudio se empleó un aislado porcino de *T. spiralis*, proporcionado por el Dr. Martínez-Marañón, del Instituto Nacional de Referencias Epidemiológicas (INDRE). Las LM de *T. spiralis*, se obtuvieron a partir de músculo de ratones infectados con el parásito mediante la digestión artificial con Pepsina-Acido Clorhídrico al 1%.

5.2 MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA Y OBTENCION DE LARVAS MUSCULARES DE *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratones BALB/c, los cuales se infectaron con 800 LM de *T. spiralis* por vía intragástrica. La obtención de las LM se realizó según la metodología descrita por Dennis y cols. (1970). Para ello, ratones BALB/c infectados con *T. spiralis* se sacrificaron, se les quitó la piel, las extremidades, las vísceras y el músculo esquelético restante se digirió con una solución de Pepsina-Ácido Clorhídrico al 1% por 3 h a 37°C, en agitación constante. Posteriormente, la solución se pasó por cuatro capas de gasa y se procedió a sedimentar las larvas, por 20 min, las cuales se colocaron en tubos Falcon de 15 mL. Las larvas se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) (Apéndice) pH 7.3 en una centrifuga clínica (Beckman, EUA) a 3 000 rpm por 5 min. Las LM obtenidas se resuspendieron en agar suave al 0.2% y se tomaron 5 alícuotas de 10 µl para determinar el número de parásitos.

5.3 OBTENCION DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO MUSCULAR DE ANIMALES DE RASTRO

Se llevaron a cabo un total de 9 colectas durante 4 meses, cinco de las cuales se realizaron en el rastro TIF, en un período comprendido del 30 de mayo al 1 de agosto de 1998 y las otras cuatro se realizaron en el rastro rural "5 de Junio" durante el mes de septiembre del mismo año (Tabla 6).

Tabla 6. Colectas de carne de caballo de los rastros de la República Mexicana, un rastro TIF y un rastro rural.

FECHA	RASTRO (Procedencia)	No. DE MUESTRAS	LENGUA	DIAFRAGMA
30 May 98	TIF (Tuxpan, Nayarit)	20	10	10
6 Jun 98	TIF (Salinas, SLP)	40	20	20
9 Jul 98	TIF (Acaponeta, Nayarit)	40	20	20
18 Jul 98	TIF (Charcas SLP)	40	20	20
1 Ago 98	TIF (Charcas, SLP)	40	20	20
12 Sep 98	Rural (Veracruz)	40	20	20
18 Sep 98	Rural (Veracruz)	40	20	20
24 Sep 98	Rural (Veracruz)	40	20	20
30 Sep 98	Rural (Veracruz)	40	20	20
	Total	340	170	170

TIF: Tipo Inspección Federal. Unión Ganadera de Aguascalientes.

Rastro rural: "5 de Junio" S.A de C.V. (UTICA) de San Vicente Chicoloapan, Estado de México.

Se obtuvieron muestras de lengua y diafragma de 90 caballos, del rastro Tipo Inspección Federal (TIF) de la Unión de Ganaderos de Aguascalientes (U.G.A.S.A). Estos caballos provenían de los municipios de Tuxpan y Acaponeta, Nayarit y del municipio de Salinas y Charcas de San Luis Potosí. También se obtuvieron muestras de lengua y diafragma de 80 caballos del rastro Rural "5 de Junio" S.A. de C.V. (UTICA) de San Vicente Chicoloapan del Estado de México, al cual se sabe que llegan caballos de diferentes regiones del sur de la República Mexicana.

De manera paralela se tomaron muestras de sangre de cada caballo, tanto del rastro TIF como del rural, las cuales posteriormente fueron centrifugadas a 3 000 rpm por 5 min (centrífuga Beckman, EUA) para la obtención del suero, el cual fue guardado a -20°C , hasta su posterior utilización en los ensayos de ELISA.

La colecta de los tejidos y de los sueros se realizó después de que los caballos fueron eviscerados, desollados y cortados en canal, tomando muestras de lengua y de diafragma con un peso aproximado de 60 g de cada uno.

5.4 DIGESTION ARTIFICIAL

Se digirieron artificialmente las 170 muestras de tejido de diafragma y 170 de lengua de los caballos del rastro TIF y del rastro rural, de acuerdo a la metodología descrita por Dennis y cols. (1970). Las muestras de tejido de cada uno de los caballos (50g de carne) se maceraron en una Picadora Moulinex. De estas muestras, se tomaron 40 g para ser digeridas y 5 g de diafragma y lengua fueron almacenados a -20°C hasta su utilización en los ensayos de PCR. Las muestras de lengua y de diafragma se digirieron en una solución de Pepsina-HCl al 1%, por 3 h en agitación constante. Transcurrido el tiempo, las muestras se procesaron como se describió anteriormente.

5.5 EXTRACCION DEL ADN

El ADN de LM de *T. spiralis*, así como el ADN de muestras de carne de caballo a las que se les añadió un número conocido de LM y de un caballo infectado naturalmente involucrado en el brote de Toulouse, Francia (esta muestra fue amablemente donada por el Dr. Pascal Boireau), se obtuvo empleando dos metodologías, una descrita por Soulé y cols. (1993c) y la otra por Bruford y cols. (1992).

La metodología descrita por Soulé y cols. (1993c) consiste en la utilización de 0.5 g de tejido muscular de cada uno de los caballos. La muestra se incubó en amortiguador de lisis 1:10 (10 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8, 100 mM de NaCl y 0.5% SDS) y 300 µg/mL de Proteinasa K (Boehringer, Lakeside, Alemania) toda la noche a 55°C. Posteriormente se adicionó un volumen de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (FCI) (24:24:1) y se centrifugó a 3 000 rpm a 4°C por 10 min (microcentrífuga refrigerada Hettich modelo 22R, Alemania). Se tomó el sobrenadante y se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 20 µl de glucógeno (1mg/mL) y se dejó precipitar el ADN a -70°C por 1 h. Después se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min y la pastilla se disolvió en 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM de EDTA pH 8) se agregaron 20 µg/mL de RNasa libre de ADNsa (Boehringer, Lakeside, Alemania) y la muestra se incubó 1 h a 37°C. Transcurrida esta incubación, se adicionó un volumen de FCI (24:24:1) y se centrifugó a 3 000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol y se precipitó el ADN por 1 h a -70°C. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min y la pastilla se lavó dos veces con 500 µl de Etanol a 70% (Merck) y se centrifugó igual que en el paso anterior. El sobrenadante fue eliminado invirtiendo el tubo por 5 min a temperatura ambiente y se dejó que se secase. Después, la pastilla se disolvió en 200 µl de TE y el ADN se cuantificó y se

analizó electroforéticamente en geles de agarosa al 1%. Las muestras se guardaron a -20°C hasta la realización de los ensayos de PCR.

La metodología descrita por Bruford y cols. (1992), consistió en macerar 1 g de muestra de tejido de los caballos con 20 mL de Nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. El contenido se vació a un tubo Falcon cónico de 15 mL, al cual se le adicionaron 5 mL de la solución de lisis (0.05 M Tris-HCl pH 8, 0.1 M EDTA pH 8 y 0.5 % Sarkosyl) y 10 µg/mL de RNasa libre de ADNAs (Boehringer, Lakeside, Alemania) y se incubó 1 h a 37°C. Una vez realizado lo anterior, se adicionaron 100 µg/mL de Proteinasa K (Boehringer, Lakeside, Alemania) y la mezcla se incubó 2 h a 55°C y 1 h a 65°C. Después, se tomó 1 mL del sobrenadante y se le agregó NaCl 5M hasta una concentración final 2M, la mezcla se agitó durante 15 seg y se centrifugó a 3 000 rpm a 4°C por 10 min. A la fase orgánica se le adicionó 1 volumen de Fenol saturado (Gibco BRL, Gran Island, New York, EUA) y se centrifugó igual que el paso anterior. Se tomó el sobrenadante y se le adicionó 1 volumen de Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó a 3 000 rpm a 4°C durante 10 min, este paso se repitió dos veces. Al sobrenadante obtenido se le adicionó un volumen de alcohol isopropílico al 100% (Merck) y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min y la pastilla se lavó dos veces con 500 µl de Etanol al 70% (Merck) y se centrifugó igual que el paso anterior. El sobrenadante fue eliminado invirtiendo el tubo por 5 min a temperatura ambiente y la pastilla se secó por centrifugación al vacío durante 10 min para eliminar los restos de etanol. Finalmente, las pastillas se resuspendieron en 50 µl de agua desionizada y el ADN se cuantificó. La integridad de la muestra se analizó en geles de agarosa al 1% y se guardó a -20°C hasta su uso posterior en los ensayos de PCR.

5.6 CUANTIFICACION DEL ADN POR ESPECTOFOTOMETRIA

Para la cuantificación del ADN se utilizó la metodología descrita por Sambrook y cols. (1989). Para ello se utilizaron 3 µl de cada una de las muestras obtenidas y se preparó una dilución 1:50 con agua, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos en la muestra, ya que un valor de densidad óptica igual a 1, corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de doble cadena.

La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm proporciona una estimación de la pureza del ADN. Se consideran preparaciones adecuadas aquellas que presentaron una relación entre 1.8 y 2.0.

5.7 SEPARACION ELECTROFORETICA DE ADN

Para verificar que el ADN se encontraba en condiciones óptimas (íntegro y sin RNA) se corrió una alícuota de 5 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1% disuelto en TAE 1X (Apéndice) el cual contenía 0.5 µg/mL de bromuro de etidio. Antes de cargarse, la muestras se mezclaron con amortiguador de muestra (6X) (Apéndice). Se utilizó como amortiguador de corrida TAE 1X y se corrió a 5V/cm. Una vez concluída la separación electroforética, el ADN se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

5.8 AMPLIFICACION DEL ADN POR REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Para la estandarización de la técnica de PCR se utilizaron inicialmente los iniciadores oTsr1 y oTsr4, descritos por Zarlenga y Dame, (1992). Estos comparten secuencias con el ADN que codifica para el RNA ribosomal de la subunidad grande del ribosoma.

La secuencia de los iniciadores empleados es la siguiente: oTsr4 5' GTTCCATGTGAACAGCAGT 3' y oTsr1 es 5' CGAAAACATACGACAACT 3'. El producto de amplificación es de 170 pb cuando se utiliza ADN de *T. spiralis* y de 130 pb para el ADN de *T. nativa* o el genotipo T5 (Zarlenga y cols., 1996).

También se utilizaron los iniciadores pPra 203-226 y pPra 804-781, que amplifican dos fragmento de 600 y 800 pb, que forma parte de una secuencia repetida de 1.6 Kb del genoma de *Trichinella*. Estos iniciadores fueron descritos por Dupouy-Camet y cols. (1991). La secuencia de los iniciadores pPra 203-226 es la siguiente: 5' GTAAAGCGGTGGTGCATTCAT 3' y para pPra 804-781: 5' AGTTTGCATACCGAACAACCGCTC 3'. Los dos pares de iniciadores se mandaron sintetizar con la compañía OPERON (California, EUA).

Las condiciones para la PCR con los dos iniciadores fueron las mismas y se siguió la metodología descrita por Zarlenga y cols. (1996). De esta forma, la reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µl y la mezcla de reacción contenía 5 µl de amortiguador de reacción de PCR 10X (Tris-HCl 10mM, cloruro de magnesio 1.5 mM, cloruro de potasio 5mM, 0.1% de Tritón X-100, gelatina 0.1%), 10 mM de cada deoxinucleótido trifosfatado, 2.5 mM de MgCl₂, 1.25 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer Corp, San José, Ca, EUA) y 0.25 µg de cada iniciador oTsr. En el caso de los iniciadores pPra se emplearon 0.3 µg de cada uno. La mezcla de reacción se precalentó a 95°C por 5 min. Las muestras fueron sometidas a 40 ciclos de amplificación cuando se emplearon los iniciadores oTsr1 y cuando se emplearon los oligos pPra las muestras fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación. En ambos casos se usó un termociclador automático (modelo 2400, Perkin Elmer Corp, San José Ca. EUA). Cada ciclo consistió en un paso de desnaturalización de 1 min a 94°C, un paso de alineamiento de 1 min de a 55°C y un paso de extensión de 2 min a 72 °C. Después de cubrir los 40 ciclos, se llevó a cabo un paso final de extensión durante 7 min a 72°C. Las condiciones para los iniciadores pPra fueron las mismas, excepto en la cantidad de iniciadores que fue

de 0.3 µg y los ciclos de amplificación fueron 30. Como controles positivos se incluyeron: ADN de LM obtenidas por digestión artificial de ratones infectados con *T. spiralis*, así como de muestras de carne de caballo a la que se añadió un número conocido de LM. Como control negativo se incluyó ADN de la muestra de carne de caballo sin infectar.

Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TAE (1X) en presencia de 0.5 µg/mL de bromuro de etidio y se corrió a 10 V/cm por 1 h. Antes de cargarse la muestras se mezclaron con amortiguador de muestra (6X). Se utilizó como amortiguador de corrida TAE (1X). Los pesos moleculares utilizados fueron un marcador de ADN XIII, con un rango de 50 a 750 pb con una banda adicional de 2642 pb (Boehringer Mannheim, Alemania). Una vez concluida la separación electroforética, el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

6. RESULTADOS

La presencia de LM de *Trichinella* en muestras pareadas de tejido de diafragma y lengua de 90 caballos sacrificados en el rastro TIF de la Unión Ganadera de Aguascalientes y en muestras de 80 caballos obtenidas del rastro rural "5 de Junio" del Estado de México se analizó, empleando el método de digestión artificial. Los resultados mostraron que en ninguna de las 340 muestras analizadas se encontraron LM de *Trichinella*.

Con el objetivo de determinar por la PCR, la presencia de *Trichinella* en muestras de tejido de diafragma y lengua de caballos colectadas en el rastro TIF y en el rastro rural, se procedió a la estandarización de esta técnica. Esta se realizó empleando dos metodologías para la extracción del ADN de la LM de *T. spiralis*, la primera descrita por Soulé y cols. (1993c) y la segunda descrita por Bruford y cols. (1992). Además se emplearon dos diferentes juegos de iniciadores: los oTsr-1 y oTsr-4, que comparten secuencias con el ADN que codifica para el RNA ribosomal de la subunidad grande (Zarlenga y Dame, 1992) y los iniciadores pPra 203 y pPra 804 que forman parte de una secuencia repetida de 1.7 Kb descritos por Dupouy-Camet y cols. (1991). Las condiciones de amplificación empleadas en cada caso se describieron en la sección de metodología.

Cuando se amplificaron diferentes concentraciones del ADN de la LM de *T. spiralis* obtenido de acuerdo a Soulé y cols. (1993c) con los iniciadores oTsr, se amplificó un producto de 170 pb. La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 ng de ADN que corresponde aproximadamente a 0.002 de LM. No se observó un producto de amplificación con el ADN obtenido del diafragma de ratón no infectado con *T. spiralis* (Fig. 6).

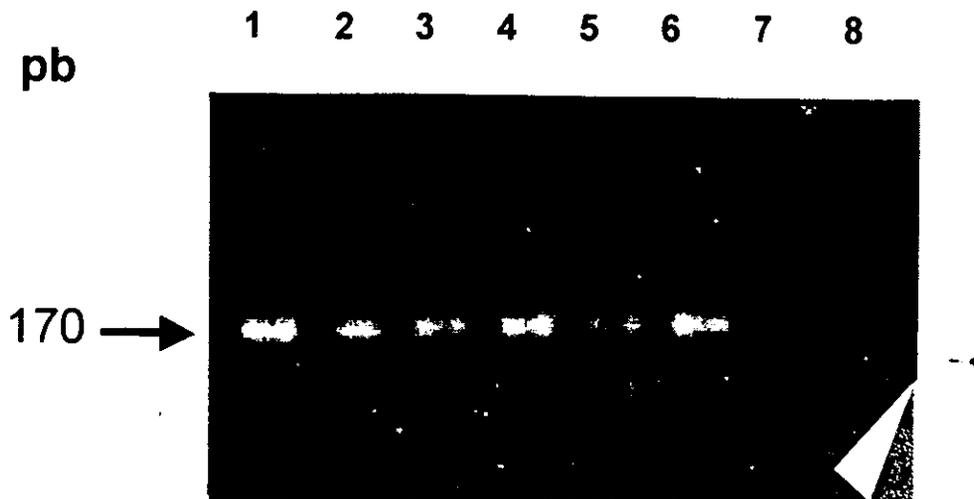


Figura 6. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores oTsr y con diferentes concentraciones del ADN de larvas musculares de *Trichinella spiralis*, extraído de acuerdo a lo recomendado por Soulé y cols. (1993c). Carril 1, 1200 ng; carril 2, 600 ng; carril 3, 300 ng; carril 4, 30 ng; carril 5, 1 ng; carril 6, 0.2 ng; carril 7, 500 ng de ADN de ratón no infectado con LM de *T. spiralis*; carril 8, control de reactivos.

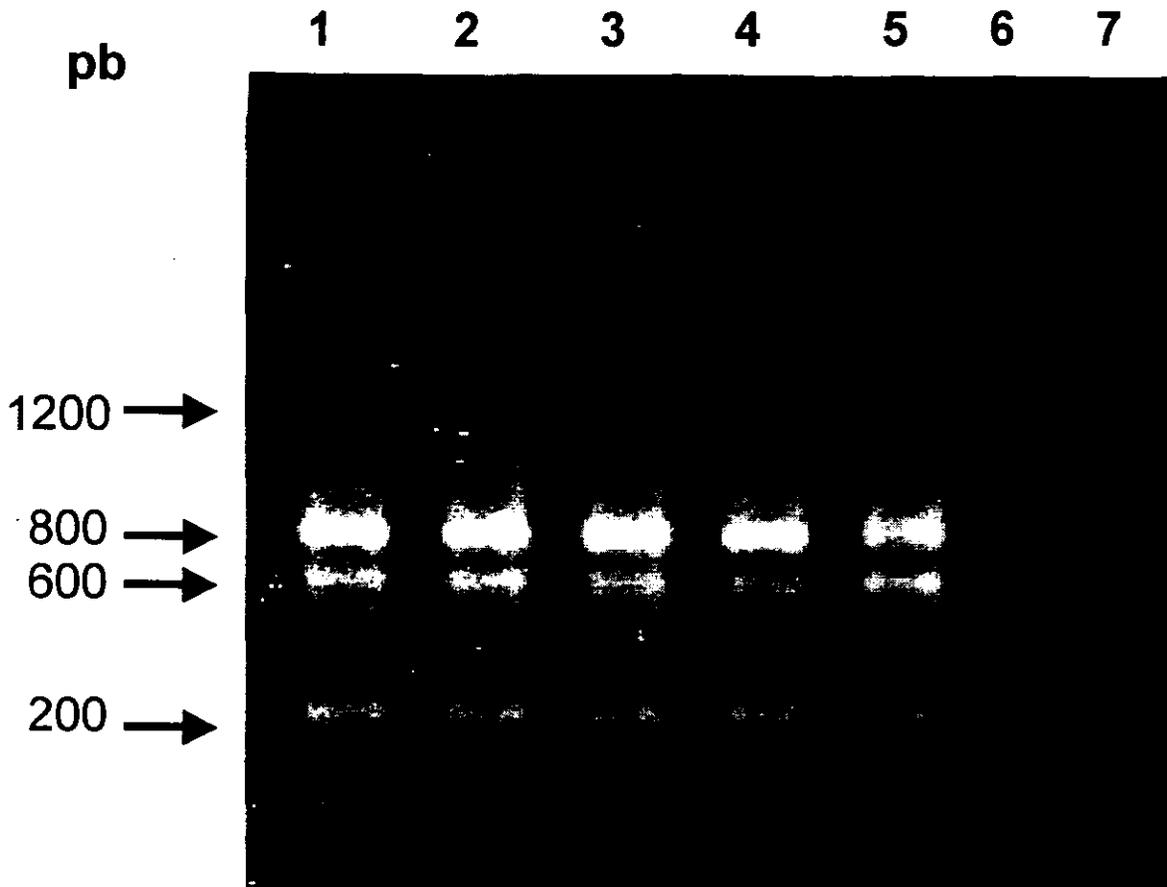


Figura 7. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra y con diferentes concentraciones del ADN de larvas musculares de *Trichinella spiralis*, extraído de acuerdo a lo recomendado por Bruford y cols. (1992). Carril 1, 1000 ng; carril 2, 600 ng; carril 3, 300 ng; carril 4, 75 ng; carril 5, 7 ng; carril 6, 500 ng de ADN de ratón no infectado con LM de *T. spiralis*; carril 7, control de reactivos.

Por otro lado, cuando se amplificó el ADN de la LM obtenida de acuerdo a lo descrito por Bruford y cols. (1992) empleando los iniciadores pPra 203 y pPra 804, se observaron dos fragmentos específicos de 600 y 800 pb y uno no específico de 200 pb (Fig.7). En este ensayo se utilizaron diferentes concentraciones de ADN de la LM de *T. spiralis* obteniéndose una sensibilidad de 7 ng. Como control negativo se utilizó 500 ng de ADN de ratón no infectado con la LM de *T. spiralis* y no se obtuvo producto de amplificación.

La sensibilidad de la técnica de la PCR empleando el ADN obtenido de 1 g de diafragma de caballo no infectado (negativo por ELISA y digestión artificial) al cual se le adicionaron 1200 LM de *Trichinella spiralis* siguiendo la metodología de Bruford y cols. (1992) fue de 7 ng (Fig. 8). Se observó la amplificación de los productos específicos de 600 y 800 pb, cuando se usaron concentraciones de 1000 ng hasta 7 ng, lo cual corresponde a 0.14 del ADN de LM (Fig. 8, carril 1-5). Cuando se amplificó el ADN de 1 g de diafragma del mismo caballo sin adicionar LM de *T. spiralis* (100 ng) no se obtuvieron productos de amplificación.

Por otro lado, se amplificó el ADN de una muestra de diafragma de caballo infectado naturalmente con larvas de *T. spiralis*, causante del último brote de trichinellosis humana ocurrido en Toulouse, Francia en 1998, con una carga parasitaria de 9 LPG, determinada por digestión artificial. El ADN de esta muestra se extrajo siguiendo las dos técnicas antes descritas. Sin embargo, a diferencia de la obtención del ADN de LM purificadas, en donde ambas metodologías tienen resultados eficientes, la extracción del ADN del diafragma de caballo infectado siguiendo la técnica reportada por Bruford y cols. (1992) permitió obtener el ADN en mejores condiciones de integridad así como en cantidad con respecto a lo recomendado por Soulé y cols. (1993c).

Con respecto, a la amplificación del ADN de esta muestra empleando los iniciadores pPra se obtuvieron los 2 productos de amplificación específicos de 600

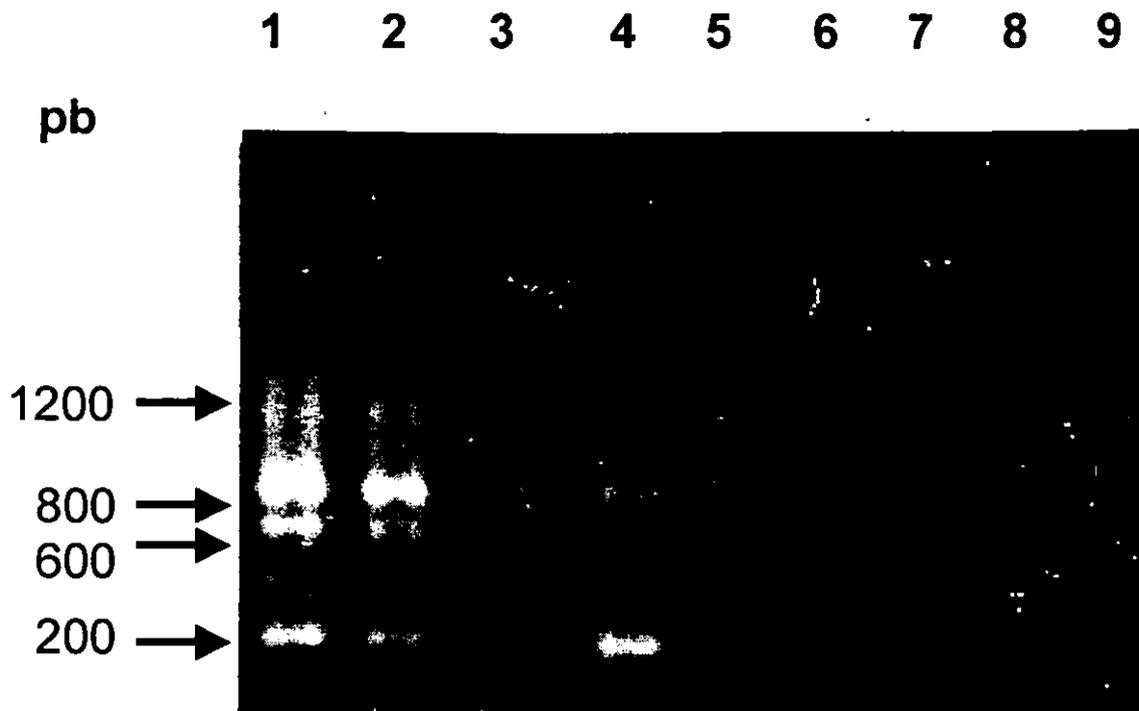


Figura 8. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando diferentes concentraciones del ADN de diafragma de carne de caballo no infectado al cual se le adicionaron 1200 larvas musculares de *Trichinella spiralis*. Carril 1, 1000 ng. Carril 2, 500 ng; carril 3, 250 ng; carril 4, 31 ng; carril 5, 7 ng; carril 6, 3 ng; carril 7, 1 ng; carril 8, 100 ng de carne de caballo sin LM; carril 9, control de reactivos.

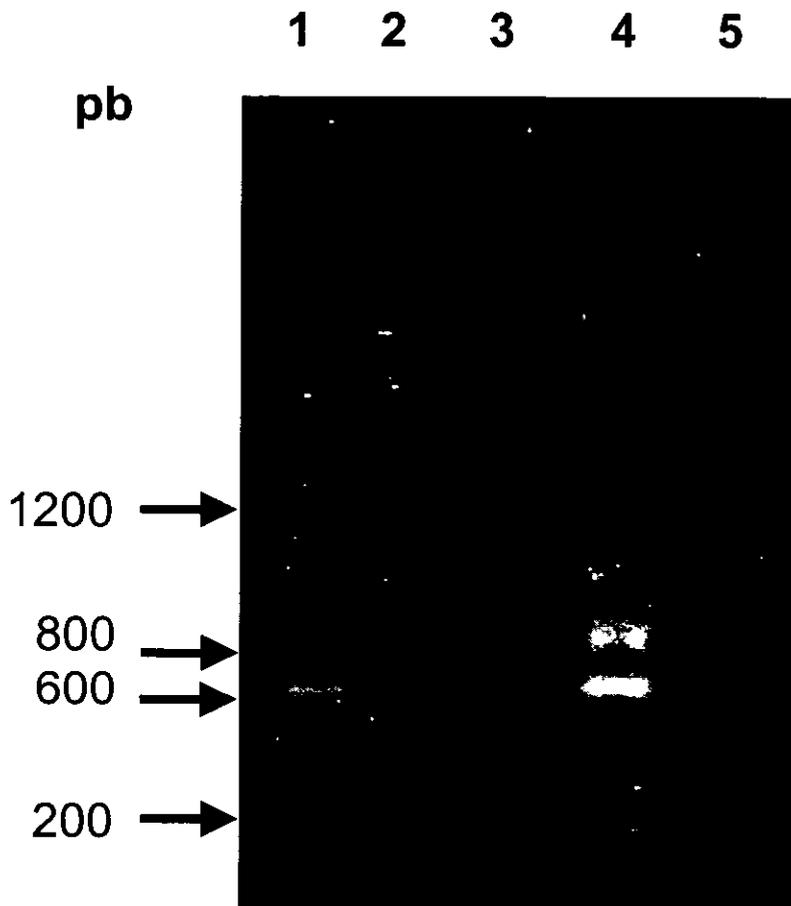


Figura 9. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa empleando diferentes concentraciones del ADN del diafragma de un caballo infectado naturalmente con larvas musculares de *Trichinella spiralis* (9 LPG) y los iniciadores pPra. Carril 1, 270 ng. Carril 2, 75 ng; carril 3, 50 ng; carril 4, 100 ng del ADN de LM de *T. spiralis* purificados; carril 5, control de reactivos.

y 800 pb (Fig. 9). Estos productos se lograron amplificar empleando desde 270 hasta 75 ng de ADN de la muestra. A concentraciones menores no se detectó la amplificación de estos productos.

Cabe mencionar que cuando se empleó ADN obtenido de diafragma de caballo siguiendo la técnica de Bruford y cols. (1992) y los iniciadores oTsr-1 y oTsr-4 no se obtuvo amplificación. Considerando lo anterior, se procedió a obtener el ADN de las muestras de diafragma y lengua de los caballos de rastro siguiendo lo recomendado por Bruford y cols. (1992). Para los ensayos de PCR se emplearon 500 ng del ADN así purificado y los iniciadores pPra.

Así, se realizó la técnica de PCR del ADN obtenido de las muestras de diafragmas de 90 caballos de rastro TIF y del ADN de 23 muestras de lengua de caballos que resultaron positivas en diafragma, además de algunas muestras negativas en diafragma. De las muestras de diafragma, sólo en 2/90 (2%) de ellas (caballo, 67 y 68), se detectó una banda de 800 pb como producto de amplificación (Fig. 10, carril 1 y 2). Al realizarse la PCR de las muestras pareadas de lengua, sólo en el caballo 68 se obtuvo un producto de amplificación de 800 pb (Fig. 10, carril 3). Sin embargo, 2 muestras negativas en diafragma resultaron positivas en lengua (caballo, 64 y 69) (Fig. 10, carril 4, 5). De esta forma, 3/23 (13%) muestras de lengua fueron positivas por PCR.

El análisis de las 80 muestras de diafragma de caballos de rastro rural "5 de Junio", mostró que 11/80 (14%) muestras fueron positivas, observándose los productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb en una de las muestras y en las demás muestras se observó principalmente un producto de 600 pb (Fig. 11 y 9).

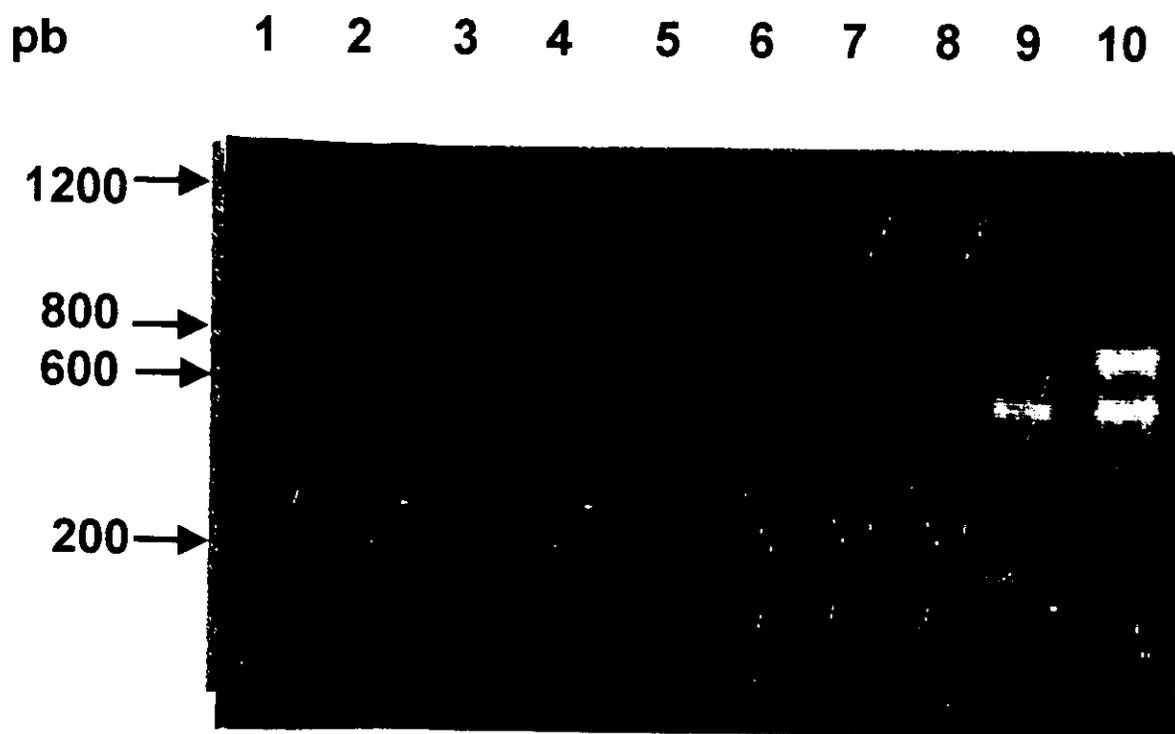


Figura 10. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y Lengua (L) de los caballos del rastro Tipo Inspección Federal. Carril 1, ADN del caballo 67 (D); carril 2, ADN del caballo 68 (D); carril 3, ADN del caballo 68 (L); carril 4, ADN del caballo 64 (L); carril 5, ADN del caballo 69 (L); carril 6, ADN del caballo 21 (D); carril 7, ADN del caballo 66 (D); carril 8, control de reactivos; carril 9, 200 ng de ADN de diafragma de caballo al que se le añadieron LM; carril 10, 100 ng de ADN de LM de *Trichinella spiralis*.

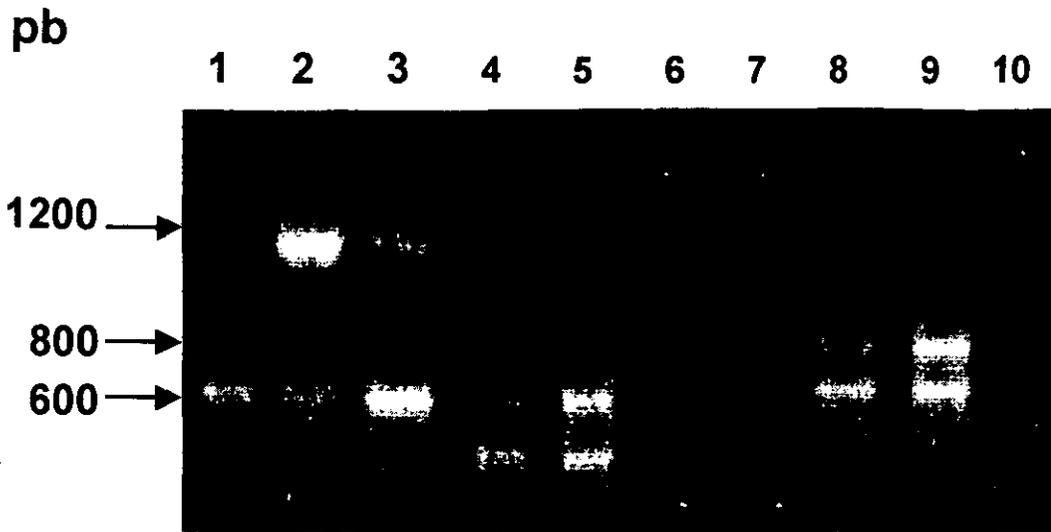


Figura 11. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y Lengua (L) de caballos del rastro rural. Carril 1, ADN del caballo 125 (L); carril 2, ADN del caballo 126 (D); carril 3, ADN del caballo 127 (D); carril 4, ADN del caballo 136 (D); carril 5, ADN del caballo 136 (L); carril 6, ADN del caballo 107 (D); carril 7 ADN del caballo 129 (D) ; carril 8, 150 ng del ADN del caballo no infectado mas 1200 LM de *Trichinella spiralis* (D); carril 9, 50 ng del ADN de LM de *Trichinella spiralis*; carril 10, control de reactivos.

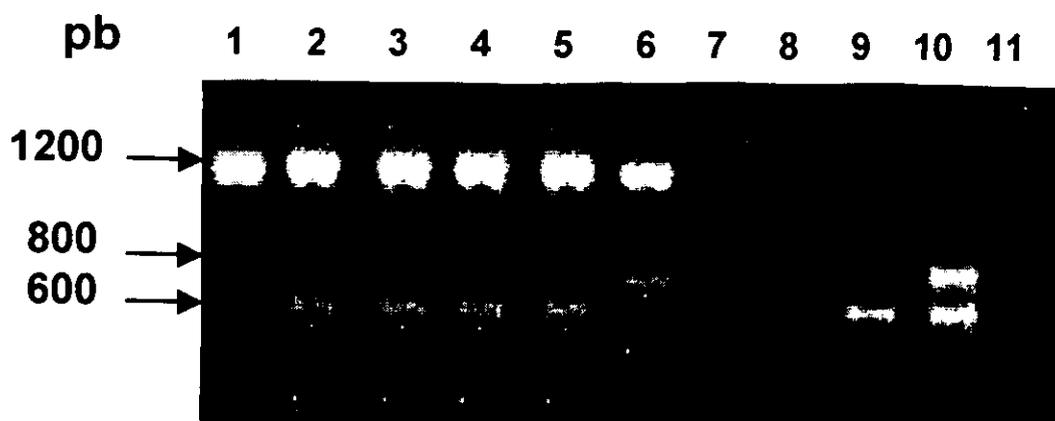


Figura 12. Análisis de los productos de amplificación obtenidos mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos con los iniciadores pPra con 500 ng del ADN de las muestras de Diafragma (D) y Lengua (L) de caballos del rastro rural. Carril 1, ADN del caballo 147 (D); carril 2, ADN del caballo 148 (D); carril 3, ADN del caballo 149 (D); carril 4, ADN del caballo 150 (D); carril 5, ADN del caballo 153 (D); carril 6, ADN del caballo 170 (D); carril 7, ADN del caballo 146 (D); carril 8 ADN del caballo 157 (D); carril 9, 150 ng del ADN del caballo no infectado mas 1200 LM de *Trichinella spiralis* (D); carril 10, 50 ng del ADN de LM de *Trichinella spiralis*; carril 11, control de reactivos.

En el caso de estas muestras se observó además un producto de 1200 pb, que también es evidente con el ADN de LM de *T. spiralis* (Fig. 11, carril 9).

Cuando se analizó por PCR el ADN de la lengua de los caballos positivos en diafragma, sólo se detectó como positiva una muestra correspondiente al caballo 136 (Fig. 8, carril 5). Sin embargo, el caballo 125 fue positivo en lengua pero negativo en diafragma (Fig. 11, carril 1). Cabe resaltar que sólo en este caballo se obtuvieron los dos productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb (Fig. 11, carril 9). De esta forma, 2/38(5%) muestras de lengua fueron positivas por PCR.

De manera paralela en otro estudio, se analizaron por ELISA muestras de suero de los 90 caballos del rastro TIF y de los 80 caballos del Rastro Rural empleando productos de E/S de LM de *T. spiralis*. En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos por digestión artificial y PCR de muestras de diafragma y lengua de caballos que por ELISA fueron positivos y de algunas otras muestras negativas por este ensayo.

De las muestras de sueros de los 90 caballos colectados del rastro TIF, 6 fueron positivas por ELISA (7%) y sólo dos de ellas positivas por PCR, una empleando ADN de lengua y la otra positiva en lengua y diafragma. Cabe mencionar que una muestra de diafragma y otra de lengua dieron positivas por PCR, habiendo resultado negativa por ELISA (caballo 67), además lo mismo se observó con una muestra de lengua (caballo 69) (Tabla 7).

Por otro lado, de las muestras de suero de 80 caballos colectadas del rastro rural, 14 (17%) fueron positivas en el ensayo de ELISA (Tabla 7). Sólo dos caballos fueron positivos tanto por ELISA como por PCR ambos cuando se amplificó el ADN del diafragma. Es importante resaltar que 10 negativos por ELISA fueron

positivos por PCR, 8 de ellos cuando se amplificó el ADN de diafragma, una con ADN de lengua y una más con ADN de diafragma y lengua.

Tabla 7. Resultados del análisis de muestras de suero, diafragma y lengua de caballos de rastro TIF y rural realizadas por ELISA, digestión artificial y PCR.

No. DE CABALLO	ELISA	DIGESTION ARTIFICIAL	PCR	
			DIAFRAGMA	LENGUA
21	+	-	-	-
64	+	-	-	+
66	+	-	-	-
68	+	-	+	+
81	+	-	-	-
86	+	-	-	-
98	+	-	-	-
101	+	-	-	-
102	+	-	-	-
105	+	-	-	-
109	+	-	-	-
123	+	-	+	-
128	+	-	-	-
137	+	-	-	-
138	+	-	-	-
139	+	-	-	-
152	+	-	-	-
155	+	-	-	-
166	+	-	-	-
168	+	-	+	-
67	-	-	+	-
126	-	-	+	-
127	-	-	+	-
136	-	-	+	+
147	-	-	+	-
148	-	-	+	-
149	-	-	+	-
150	-	-	+	-
153	-	-	+	-
170	-	-	+	-
69	-	-	-	+
125	-	-	-	+

A partir del caballo 98, las muestras se colectaron del rastro rural.

Como control de la digestión artificial a la par se obtuvieron larvas musculares del músculo de una rata infectada experimentalmente con *Trichinella spiralis*.

El ELISA se realizó empleando los antígenos de E/S de *T. spiralis* a una concentración de 5 µg/ml.

7. DISCUSION

Desde 1975, el consumo de carne de caballo ha ocasionado el 52.6 % del total de los casos (n=6250) de trichinellosis humana en la Comunidad Europea (Ancelle, 1998; Anón, 1998; Pozio, 1998).

Aunque no se tiene conocimiento del modo de transmisión de la trichinellosis a los caballos, existen dos hipótesis: 1) Por la ingestión de alimento contaminado con cadáveres de roedores infectados con *Trichinella* o por 2) la ingestión de carne de puerco o de animales silvestres contaminada con el parásito. Esta última hipótesis es apoyada por el hecho de que se emplea una mezcla de cadáveres de carnívoros criados en cautiverio, o que se cazan por su piel, para engordar a los caballos antes del sacrificio (Pozio y cols., 1997; Pozio, 2000).

La detección de caballos infectados naturalmente con *Trichinella* ha sido posible en años recientes gracias al uso de cantidades de tejido mayor (5-100 g) a la recomendada por la CEE (1g). Empleando estas condiciones se ha determinado la presencia del parásito en ocho caballos provenientes principalmente del este de Europa (Ex-Yugoslavia, Polonia y Rumania) y en cuatro caballos de México (Arriaga y cols., 1995b; Pozio y cols., 1997, 1998b, 1999b; Anón, 1998; Haeghebaert y cols., 1998).

Con respecto al número de larvas recuperadas por digestión artificial en el diafragma o en la lengua de caballos existe un rango muy amplio que va desde 0.26 a 1749 LPG. Pozio y cols. (1997), basándose en infecciones experimentales sugirieron que en caballos de rastro con pocas LPG existe la posibilidad de que se hayan infectado con menos de 10 000 LM de *Trichinella* y que se encontraban al inicio de la infección (1-3 semanas pi) o al final de la infección (después de la 15 semana pi). Asimismo, Pozio y cols. (1999b)

reportaron que cuando analizaron cortes histológicos de 3 caballos infectados naturalmente (los animales importados de Rumania y Yugoslavia), éstos presentaban una cápsula gruesa alrededor de la célula nodriza calcificada (22% de esta célula), lo cual indica una infección prolongada, por lo que los caballos pudieron adquirir la infección 8 ó 10 mese antes de ser sacrificados. En cambio, otro de los caballos infectados naturalmente (importado de Polonia), tenía un mayor número de LM (1749 en lengua y 256 en diafragma) y presentaba una cápsula delgada (promedio de 18.7 μm), por lo que se sospecha que el caballo había adquirido la infección hacia poco tiempo (entre la 5a y 12a semana pi). El hecho de haber encontrado una gran cantidad de larvas, explica porque este caballo causó el último brote de trichinellosis equina en Italia, involucrando a 404 personas (Anón, 1998).

A pesar de los hallazgos anteriores, en general, el diagnóstico de trichinellosis equina por métodos directos (digestión artificial o triquinoscopía) ha sido difícil, debido a varias razones. Entre ellas se pueden mencionar a) que los caballos presentan infecciones con un número reducido de larvas, b) la cantidad de muestra analizada, (lo que puede influenciar la recuperación del parásito) y c) al análisis de tejidos diferentes a los tejidos de predilección del parásito (Gamble y cols., 1996; Pozio y cols., 1998a,1999b). En el caso de la infección en cerdos y ovejas, los sitios predilectos son el diafragma, macetero y lengua en infecciones experimentales con *T. spiralis* (Serrano y cols., 1999). Sin embargo, el diagnóstico de la trichinellosis equina que se lleva a cabo en rastros de países desarrollados y países exportadores de carne de caballo, se realiza empleando muestras de diafragma. Es importante mencionar que se ha reportado que la lengua y el macetero son los sitios de predilección del parásito cuando los caballos tienen infecciones bajas y altas, respectivamente (Voigt y cols., 1997; Pozio y cols., 1999b). Considerando lo anterior, recientemente se ha sugerido el diagnóstico de

la trichinellosis equina empleando el método de digestión artificial se realice a partir de músculos de la cabeza del animal (Pozio y cols., 1999b).

Trichinella spiralis ha sido la única especie reportada en caballos infectados naturalmente, siendo la especie que se adapta mejor en caballos infectados experimentalmente (Polidori y cols., 1998, 1990; Soulé y cols., 1989, 1993a). En este contexto en un reporte reciente se mostró que LM de *T. spiralis* presentes en el tejido muscular de caballos infectados experimentalmente, después de 6 meses de infección y cuando los niveles de anticuerpos habían decrecido, fueron capaces de causar una infección en perros y ratones (Arriaga y cols., 1997; Pozio y cols., 1997).

En relación al diagnóstico serológico de la trichinellosis equina existen evidencias que indican que ensayos del tipo de ELISA e IET no son suficientemente sensibles para identificar a todos los caballos infectados con *Trichinella* (Pozio y cols., 1997; Yépez y cols., 1999). Por otro lado, la técnica de PCR ha sido con éxito usada en el diagnóstico de trichinellosis en ratones, cerdos y caballos infectados experimentalmente con *Trichinella* (Dupouy-Camet y cols., 1991; Soulé y cols., 1994; Uparanukraw y Morakote, 1997).

Considerando lo anterior, en este estudio se evaluó el método de PCR para el diagnóstico de trichinellosis equina en muestras de tejido de caballos de dos rastros de la República Mexicana, comparándolos con el ELISA y el método de digestión artificial.

Con respecto al análisis por digestión artificial de las muestras de diafragma y lengua, no se encontraron LM de *Trichinella* en los tejidos de los caballos de los dos rastros de la República Mexicana, a pesar de que se aumentó el tamaño de la muestra a 40 g.

La sensibilidad del ensayo de PCR con ADN de LM de *T. spiralis* purificadas y con el ADN de muestra de diafragma de caballo no infectado al que se le adicionaron 1200 LM de *T. spiralis*, fue de 7 ng en ambos casos. En este ensayo se observó la amplificación de dos fragmentos específicos de 600 y 800 pb (Fig. 11) similares a los descritos por Dupouy-Camet y cols. (1991), quienes lograron amplificar hasta 2 ng del ADN de LM de *T. spiralis* utilizando los mismos iniciadores.

El análisis por PCR de las muestras de diafragma colectadas del rastro TIF y rural, reveló 2 y 14% de positividad, respectivamente. En el rastro TIF, en dos muestras de diafragma (2%) se detectó únicamente el producto de amplificación específico de 800 pb. Cuando se analizaron por PCR 38 muestras de lengua de caballos cuyo diafragma habían dado negativos por PCR solamente en 2 de ellas se obtuvieron resultados positivos. Cabe resaltar que el caballo No. 68, proveniente de Charcas, San Luis Potosí, dio positivo cuando se analizó el ADN de los dos tejidos. En relación con el rastro rural en 11/80 de las muestras de diafragma analizada (14%) se observaron productos de amplificación específicos de 600 y/o 800 pb. De las muestras positivas, sólo un caballo resultó también positivo cuando se analizó la muestra de lengua (caballos 136). Sin embargo, de 23 muestras de lengua de caballo que resultaron negativos por PCR al analizar el diafragma, sólo una resultó positiva (caballo 125)(Fig. 11, carril, 1).

Un aspecto que hay que tomar en cuenta es que para el diagnóstico de *Trichinella* se ha recomendado el uso de la lengua por ser el tejido de predilección en los caballos con carga parasitarias bajas. Es importante mencionar que en este estudio, de 16 caballos positivos por PCR (lengua y/o diafragma), las muestras de 2 caballos fueron positivas tanto para diafragma como para lengua, y en 13 se determinaron productos de amplificación específicos cuando se analizaron los tejidos del diafragma y sólo en 3 cuando se emplearon muestras de tejido de lengua. Estos resultados son diferentes a los reportados con anterioridad (Pozio y

cols., 1999b), ya que en estos estudios el diafragma ocupa del 6° al 15° lugar en predilección por *Trichinella*. Los estudios acerca de los sitios de predilección de *Trichinella* se ha realizado en caballos infectados experimentalmente (Polidori y cols., 1988, 1990; Soulé y cols., 1987, 1993a; Gamble y cols., 1996; Voigt y cols., 1997; Yépez y cols., 1999), por lo que es necesario realizar más estudios empleando muestras de tejidos de caballos infectados naturalmente para determinar con mayor seguridad los sitios de predilección para la infección en caballos.

El hecho de que no se detectaran larvas de *Trichinella* por el método de digestión artificial en las muestras de diafragma y lengua que fueron positivas por PCR, aún cuando se aumento la muestra analizada (40 g) sugiere que la carga parasitaria es baja. Sin embargo, es posible que en otros tejidos, el número de LM sea más alto (Gamble y cols., 1996; Pozio y cols., 1997), aunque la lengua es uno de los músculos de la cabeza que se recomienda muestrear para el diagnóstico de la trichinellosis en caballos empleando el método de digestión artificial (Pozio y cols., 1999b).

Actualmente se recomiendan los músculos de la cabeza para el diagnóstico de la trichinellosis equina. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados de PCR, las muestras de tejido de diafragma todavía analizadas en muchos rastros empleando el método de digestión artificial parecen ser adecuadas. Por otra parte, es de interés mencionar que en algunas de las muestras de diafragma y lengua de caballos del rastro rural se amplificó un producto de 1,200 (Fig. 11 y 12). Este producto sólo ha sido reportado por Dick y cols. (1992), cuando analizaron por PCR, el ADN de aislados de *Trichinella* obtenidos únicamente de animales domésticos (cerdos, gatos, ratas y zorros) empleando los oligonucleótidos pPra. En este estudio, también se evidenció que no en todos los aislados domésticos considerados por los autores como *T. spiralis* se observó, el

producto de 1,200 pb (9/12 aislados) lo cual pudiera deberse al bajo número de copias presentes. Estos resultados sugieren la existencia de diferencias entre los mismos aislados de *T. spiralis*.

En el caso de las muestras de diafragma analizadas en este estudio, también se observó heterogeneidad en cuanto a la amplificación del producto de 1,200 pb. Con el empleo de los iniciadores pPra no se tiene la certeza de que la especie de *Trichinella* detectada sea *T. spiralis*. Por lo que para determinar la especie sería necesario el empleo de otros iniciadores como los descritos por Takahashi y cols. (1997) y un ensayo de PCR múltiplex (Zarlenga y cols., 1999).

Por PCR el mayor porcentaje de positividad en muestras de diafragma (14%) se encontró en el rastro rural en caballos que provenían de Veracruz. Las muestras positivas (2%) encontradas en los caballos del rastro TIF, provenían de Nayarit y San Luis Potosí. Estos resultados sugieren que la trichinellosis equina, se encuentra restringida en ciertas regiones de la República Mexicana. Estos datos concuerdan con los obtenidos en un estudio previo que se llevó a cabo en el mismo rastro rural en el que se detectaron 4 de 80 muestras positivas para *Trichinella spiralis*, las cuales provenían de Veracruz y Tabasco (Arriaga y cols., 1995b).

Con respecto a los resultados obtenidos por ELISA y PCR sólo algunos de los caballos se detectaron como positivos por las dos técnicas. De 20 muestras positivas por ELISA, sólo en 4 de ellas se confirmó a presencia del parásito por PCR. Sin embargo, 12 muestras negativas en ELISA dieron resultados positivos por PCR, ya sea en diafragma y/o lengua, por lo que se sugiere que estos caballos tenían una infección temprana o tardía acorde con lo que se ha reportado refererido a que en estas dos situaciones se presentan los niveles bajos de anticuerpos (Soulé y cols., 1993a,b; Pozio y cols., 1997; Yépez y cols., 1999).

Por otro lado, los caballos positivos por ELISA empleando los productos de E/S de *T. spiralis*, pero negativos por PCR, pudieron ser falsos positivos, debido a otras infecciones por parásitos que tengan antígenos con reactividad cruzada con *Trichinella*. A este respecto, estudios recientes han mostrado que extractos crudos obtenidos de diferentes estadios de nematodos como *Ascaris suum*, *Anasakis simples*, *Haemonchus contortus*, *Trichuris muris* y *Toxocara canis* son reconocidos por un anticuerpo monoclonal que reconoce a la tivelosa de *Trichinella spiralis*, presente en los antígenos de E/S y que le confiere a estas moléculas su inmunodominancia (De Ayuela y cols., 2000). Con anterioridad, se consideró que la tivelosa era específica del género *Trichinella*, sin embargo, las evidencias mencionadas anteriormente, sugieren la presencia de reactividad cruzada con otros parásitos. Lo anterior pudiera explicar los resultados de ELISA y PCR, sin embargo, se requiere determinar si en extractos de parásitos específicos del caballo, se observa reactividad cruzada con los productos de E/S de *T. spiralis* y en especial con la β -tivelosa.

Tomando en cuenta las evidencias que indican que el parásito puede estar viable en el músculo y el título de anticuerpos en caballos infectados sea bajos, los métodos serológicos no son lo suficientemente sensibles. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan lo anterior y demuestran la utilidad de la PCR en el diagnóstico de la trichinellosis equina. Así, es necesario que en el diagnóstico de la trichinellosis equina se utilicen métodos alternativos como la PCR, la cual es sensible, específica e indica la presencia del parásito en los animales analizados. Los resultados obtenidos en este estudio, empleando técnicas moleculares, así como los obtenidos en estudios previos (Arriaga y cols., 1995b; Yépez y cols., 1999), demuestran que la presencia de la trichinellosis equina en rastros de la República Mexicana es alta. Esta parasitosis pone en riesgo a una gran parte de la población en nuestro país, ya que se considera que cerca del 35% de la producción equina es para consumo humano (Benitez,

comunicación personal). Sin embargo, el diagnóstico de la trichinellosis equina sólo se realiza en los rastros TIF, donde se exportan las canales a países europeos y Japón.

Es importante notar que las investigaciones epidemiológicas de los cuatro brotes más recientes ocurridos en Italia en 1998, indican que los caballos infectados naturalmente con el parásito provenían de países con una alta prevalencia de trichinellosis en cerdos o animales silvestres, sugiriendo que existe una relación entre la infección de estos animales y los caballos (Anón, 1998; Pozio, 2000). Estos reportes indican que la trichinellosis equina esta localizada y esta reemergiendo principalmente del este de Europa (Pozio y cols., 1999b; Pozio, 2000).

La alta positividad encontrada de trichinellosis equina especialmente en el rastro rural, al cual llegan caballos principalmente del sur del país, podría indicar una alta prevalencia de la trichinellosis en las zonas de donde provenían los caballos.

Considerando lo anterior es de gran importancia que en México se realice la inspección de carne de caballo para *Trichinella* en todos los rastros del país, siendo la PCR una alternativa en el diagnóstico y epidemiología de la trichinellosis equina.

8. CONCLUSIONES

- 1.- Es importante determinar si existe reactividad cruzada entre los productos de excreción/secreción de *Trichinella spiralis* y componentes antigénicos de parásitos propios del caballo, con la finalidad de determinar la presencia de falsos positivos en el ensayo de ELISA realizando en este estudio.

- 2.- La alta positividad encontrada por PCR en el rastro rural (14%), al cual llegan caballos principalmente del sur del país, podría indicar que la trichinellosis equina es endémica en varias zonas de nuestro país.

- 3.- La PCR es un método útil y alternativo en el diagnóstico y epidemiología de la trichinellosis equina.

9. APENDICE

Amortiguador de fosfatos salino (PBS)

150 mM Cloruro de sodio, 16 mM fosfato de sodio dibásico, 4 mM fosfato de sodio monobásico, 2 g Cloruro de potasio, ajustar el pH a 7.3 y aforar a 1 lt.

Amortiguador de lisis

0.05 M Tris- HCl pH 8, 0.1 M EDTA pH 8 y 0.5 % Sarkosyl

Amortiguador de muestra (6X)

0.025 g de azul de bromofenol, 0.025 g de xilen cianol, 3 ml de glicerol y aforar a 10 ml

Amortiguador Tris Acetato (TAE 50X)

242 g de Trisma base, 57.1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8) y aforar a 1 lt.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alcantará P. P., La Rosa A. J. y Correas B. D. (1992). Triquinelosis: Una parasitosis fuera de serie. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. México, D. F., Pp. 2-6.
- Ancelle T., Dupouy-Camet J., Heyer F., Faurant C. and Lapierre J. (1985). Outbreak of trichinosis due to horse meat in the Paris area. *Lancet*, 8456: 660.
- Ancelle T., Dupouy-Camet J., Heyer F., Faurant C., Lapierre J., Parham G., Leese W. and Leigty J. C. (1986). Horsemeat associated trichinosis-France. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 35: 291-298.
- Ancelle T., Dupouy-Camet J., Bougnoux, M. E., Fourestie V., Petit H., Mougeot G., Nozais J. P. and Lapierre J. (1988). Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *American Journal of Epidemiology*, 127: 1302-1311.
- Ancelle T., Dupouy-Camet J., Desenclos J.C., Maillot E., Savage-Houze S., Charlet F., Drucker J. and Moren A. (1998). A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France en 1993. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(4):615-619.
- Andy, J. J., O'Connell J. P., Daddario R.C. and Roberts W.C. (1977). Trichinosis causing extensive ventricular mural endocarditis with superimposed thrombosis. Evidence that severe eosinophilia damages endocardium. *American Journal of Medicine*, 63:824-829.
- Anón. (1998). Outbreak of trichinellosis associated with the consumption of horse meat in the Midi-Pyrénées region of France-September-October 1998. *Eurosurveillance Weekly*, 51:3-5
- Appleton J. A., Bell R. G., Homan W. and van Knapen F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*, 7(8): 190-192.
- Appleyard G. D., Zarlenga D., Pozio E. and Gajadhar A. A. (1999). Differentiation of *Trichinella* genotypes by polymerase chain reaction using sequence specific primers. *Journal of Parasitology*, 85(3):556-559.
- Arriaga C., Muñiz E., Morilla A. and Ortega-Pierres M. G. (1989). *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Experimental Parasitology*, 69: 363-372.

- Arriaga C., Salinas-Tobón R., Morilla A. and Ortega-Pierres M. G. (1991). Use of purified surface/stichosomal antigens of *Trichinella spiralis* muscle larva in the detection of naturally infected swine. *Research and Reviews in Parasitology*, 51(1-4): 103-105.
- Arriaga C., Yépez-Mulia L., Morilla A. and Ortega-Pierres M. G. (1994). Avances y prespectivas en el diagnóstico de la triquinelosis porcina. En: *Ciencia Veterinaria*. Ed por Moreno Chan Ricardo. Universidad Nacional Autónoma de México. Impreso en México, D.F. Pp 74-104
- Arriaga C., Yépez-Mulia L., Morilla A. and Ortega-Pierres M. G. (1995a). Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larva antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. *Veterinary Parasitology*, 58: 319-326.
- Arriaga C., Yépez-Mulia L., Viveros N., Adame L. A., Zarlenga D.S., Lichtenfels J. R., Benitez E. and Ortega-Pierres M. G. (1995b). Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *Journal of Parasitology*, 81(5):781-783.
- Arriaga C., Socci G., Labranderos E., Monroy, J., Diosdado F. and Morilla A. (1997). Infectivity of *Trichinella spiralis* L1 larvae present in horse muscle tissue six months after infection. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp.143-147.
- Bandi C., La Rosa G., Bardin M. G., Damiani G., de Carneri I. and Pozio E. (1993a). Arbitrarily primed polymerase chain reaction of individual *Trichinella* specimens. *Journal of Parasitology*, 79(3):437-440.
- Bandi C., La Rosa G., Comincini S., Damiani G. and Pozio E. (1993b). Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*, 107:419-424.
- Battelli G., Guberti V. and Martini M. (1994). Trichinellosis control in Italy: Considerations on sampling in imported horses and their meat. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell C. W., Pozio E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 593-598.
- Boni P., Zanardi G. and Lodetti E. (1989). Rinvenimento di larve di *Trichinella* in carne di cavallo. *Selezione Veterinaria*, 30: 1179-1183.
- Bourée P., Leymarié J. L. and Aubé C. (1988). Epidemiological study of two outbreaks of trichinosis in

- France due to horse meat. In: Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 382-386.
- Bruford W. M., Hanotte O., Brookfield J. F. and Burke T. (1992). Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. In: molecular genetic analysis of populations. Ed. Hoelzel A. R. Oxford University Press. Pp. 227-229.
- Cabral-Soto J., Villicaña-Fuentes H., Fragoso-Uribe R. y Contreras A. (1990). Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública de México, 32(5): 575-582.
- Carneri de I., Ancelle T., Dupouy-Camet J. and Pozio E. (1988). Different aetiological agents cause the european outbreaks of horsemeat induced human trichinellosis. In: Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 387-391.
- Contreras A. A. J. y Herrera E. R. (1992). Triquinosis porcina en el estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología, 3(1): 25-27.
- Correa D., De la Rosa J. L. and Ortega-Pierres M. G. (1997). Trichinellosis: human epidemiological data in México from 1939 to 1995. In: Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp. 519-523.
- De Ayuela M. A., Romaris F., Ubeira F. M., Rama S., Martínez-Fernández A. and Bolas F. (2000). Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. In: Trichinellosis: Abstract of the 10th International Conference on Trichinellosis. Fontainebleau, Francia. 20-24 de Agosto. Pp 73.
- De la Rosa J.L., Aranda J. G., Padilla E. and Correa D. (1998). Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. International Journal for Parasitology, 28:317-321.
- Dennis D. T., Despommier D. D. and Davis N. (1970). Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. Journal of Parasitology, 56(5): 974-977.
- Despommier D. D. (1983). Biology. In: *Trichinella* and trichinosis W. C.

- Campel. Ed. New York: Plenum press. Pp75.
- Despommier D. D., Symmans W. F. and Dell R. (1991). Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with *Trichinella spiralis* trichinosis. *Journal of Parasitology*, 77:290.
- DeVos T., Klassen R. and Dick A. T. (1988). Sequence analysis of a 1.6 kb repetitive element from a porcine isolate of *Trichinella spiralis*. *Nucleic Acids Research*, 16(7):3114-3115.
- Dick T. A., Lu M., deVos T. and Ma K. (1992). The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*, 78(1):145-148.
- Dupouy-Camet J., Soulé C., Guillou, J. P. Rouer E., Lavareda de Sounza S., Ancelle T. and Bénarous R. (1991). Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitology Research*, 1991, 77:180-182.
- Dupouy-Camet J., Soule C. and Ancelle T. (1994). Recent news on trichinellosis: Another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite*, 1: 99-103.
- Dupouy-Camet J. (1997). Role of sylvatic *Trichinella* in horse-meat transmission of trichinellosis. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp. 545-550.
- European Economic Community (1977). Council Directive of 21 December 1976 on the examination for trichinae (*Trichinella spiralis*) upon importation from third countries of fresh meat derived from domestic swine (no. 77/96/EEC). *Official Journal of the European Communities*, 20: L 26/67-77.
- European Economic Community (1984). Commission Directive of 7 June 1984 amending the Annexes to Council Directive 77/96/EEC on the examination for trichinae (*Trichinella spiralis*) upon importation from third countries of fresh meat derived from domestic swine (no. 84/319/EEC). *Official Journal of the European Communities*, 27:L 67/34-43.
- European Economic Community (1989). Commission Directive of 27 April 1989 amending for the second time the Annexes to Council Directive 77/96/EEC on the examination for trichinae (*Trichinella spiralis*) upon importation from third countries of fresh meat derived from domestic swine (no. 84/321/EEC). *Official Journal of the European Communities*, 32:L1 33/33-35.
- European Communities. (1994). Commission Decision of 31 January 1994 relating to protection measures

- concerning trichinosis (no. 94/60/EC). Official Journal of the European Communities, 37:L 27/55.
- Forbes L. B. and Gajadhar A. A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *Journal of Food Protection*, 62 (11): 1308-13.
- Fourestie V., Douceron H., Brugieres T., Ancelle R., Lejonc J.L. and Gherardi R. K. (1993). Neurotrichinosis. A cerebrovascular disease associated with myocardial injury and hyperosinophilia. *Brain*, 116: 603-616.
- Gamble H. R., Anderson C. E., Graham A. R. and Murrell K. D. (1983). Diagnosis swine of trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Veterinary Parasitology*, 13: 349-361.
- Gamble H. R., Gajadhar A. A. and Solomon M. B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. *Journal of Food Protection*, 59: 420-425.
- Gamble H. R., Gajadhar A. A. and Solomon M. B. (1997). Sensitivity of direct and indirect methods for the detection of trichinellosis in pigs and horses. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, F. Pp. 447-452.
- Gamble H. R. (1999). Factors affecting the efficiency of pooled sample digestion for the recovery of *Trichinella spiralis* from muscle tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 73-78.
- Haegherbaert S., Sevat M., Duchen D., Minet J.C., Agrech A.E. Thiése I. Declerc C., Vaillant V. Hemery C. Maillot E., Soule C., Pozio E., Massip P., Mangnaval J. F. and Desencios J.C. (1998). Outbreak of trichinellosis in the Midi-Pyrénées region of France January-March 1998. *Eurosurveillance*, 3(8-9):83-85.
- Hernández M., Ramos-Martínez E., Casco-Sánchez E. J., Morales-Gómez J. M. y Pérez-Matos E. M. (1992). Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. *Gaceta Médica de México*, 128(1): 45-50.
- International Committec Office International des Epizooties (1992). *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. Second Edition. Ed. Standars Commission and approved by the International Committed of the O.I.E. Pp. 543-547.
- Jongwutiwes S., Chantachum N., Kraivichian P., Siritasien P., Putaporntip Ch. Tamburrini A., La

- Rosa G., Sreesunpasirikul C., Yingyoud P and Pozio E. (1998). First outbreak of human trichinellosis caused by *Trichinella pseudospiralis*. *Clinical Infectious Diseases*, 26:111-115.
- Kapel C. M. O. and Gamble H. R. (2000). Infectivity, persistence and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *International Journal for Parasitology*, 30: 215-221.
- La Rosa G., Pozio E., Rossi P. and Murrell D. (1992). Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology*, 78(4):641-646.
- Laurichesse H., Cambon M., Perre D. Ancelle T., Mora M., Hubert B. Beytout J. and Rey M. (1997). Outbreak of trichinellosis in France associated with eating horse meat. *Communicable Disease Report*, 7:69-73.
- Lazarevic M. A., Neskovic N. A., Goronja M., Golubovic S., Komic J., Bojic M. and Popovic D. A. (1999). Low incidence of cardiac abnormalities in treated trichinosis: a prospective study of 62 patients from a single-source outbreak. *American Journal of Medicine*, 107:18-23.
- Luque-Hernández R. (1996). Determinación de *Trichinella spiralis* en cerdos de Juchitepec, Estado de México. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Martínez-Marañón R. (1983). Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. *Salud Pública de México*, 25(6): 574-578.
- Martínez-Marañón R. (1985). ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo" ? *Salud Pública de México*, 27(1): 40-51.
- Martínez-Marañón R., Escobar-Luján M., Bañuelos-Robles M. y Díaz-Castorena G. (1985). Otro brote de triquinosis en la ciudad de Zacatecas y observaciones sobre la eosinofilia de esta enfermedad. *Salud Pública de México*, 27(2): 174-179.
- Mazzotti L. and Alcántara O. (1954). Incidencia de *Trichinella spiralis* en 900 ratas (*Ratus norvegicus*) de la Ciudad de México. *Revista del Instituto de Salubridad de Enfermedades Tropicales*, 14: 201-202.
- Moorhead A., Grunenwald P. E., Dietz V. J., and Schantz P. M. (1999). Trichinellosis in the United States 1991-1996; Declining but not gone. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, 60(1):66-69.
- Monroy H., Flores-Trujillo M., Benitez E. and Arriaga C. (2000). Swine trichinellosis in slaughterhouses of

- the metropolitan area of Toluca state of Mexico. In: Trichinellosis: Abstract of the 10th International Conference on Trichinellosis. Fontainebleau, Francia. 20-24 Agosto. Pp 181.
- Murrell K. D. (1985a). Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. Food Technology, 39(3): 65-68 y 110-111.
- Murrell K. D. (1985b). *Trichinella spiralis*: Acquired immunity in swine. Experimental Parasitology, 59(3): 347-354.
- Murrell K. D., Anderson W. R. and Schad G. A., Hanbury R.D., Kazacos K. R. Gamble H. R. and Brows J. (1986). Field evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay for swine trichinosis: Efficacy of the excretory-secretory antigen. American Journal of Reserach, 47(5): 1046-1049.
- Murrell K, D., (1994). Beef as source of trichinellosis. Parasitology Today, 10: 434.
- Nagano I., Wu, Z., Matsuo A., Pozio E. and Takahashi Y. (1999). Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. International Journal for Parasitology, 29:1113-1120.
- Ortega-Pierres M. G., Muñiz E., Coral-Vázquez R. and Parkhouse R. M. E. (1989). Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitology Research, 75(7): 563-567.
- Ortega-Pierres M. G., Yépez-Mulia L., Homan W., Gamble H. R., Lim P. L., Takahashi Y., Wasson D. L. and Appleton J. A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens; a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunology, 18: 273-284.
- Ortega-Pierres M. G., Arriaga C. and Yépez-Mulia L. (2000). Epidemiology of trichinellosis in Mexico Central and South America. Veterinary Parasitology, 93:201-225.
- Padilla L. E., De la Rosa A. J. L., Miramón P. G., Correa B. D. y Aranda J. (1994). Prevalencia de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en Cerritos S.L.P. Memorias del XI Congreso Nacional de Parasitología. Querétaro, Qro.
- Perret C., Barrat J., Calamel M., Fabien J. F., Boireau P. and Soulé C. (1997). Comparative humoral responses in a horse and a fox infected and reinfected with *Trichinella*. In: Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp. 307-312.

- Polidori G. A., Gramenzi F., Fioretti D. P., Ferri N., Ranucci S., Moretti A., Scacchia M., Bellelli C. and Baldelli B. (1988). Experimental trichinellosis in horses. In: Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 268-274.
- Polidori G. A., Gramenzi F., Moretti A., Ferri N., Fioretti D. P., Scacchia M., Bellelli C., N., Ranucci S. and Baldelli B. (1990). Trichinellosi sperimentale nel cavallo: II° esperimento nota I: Aspetti clinici e ricerche parassitologiche. *Parassitologia*, 32 (S1): 212-213.
- Pozio E., Capelli O., Marchessi L., Valeri P. and Rossi P. (1988). Third outbreak of trichinellosis caused by consumption of horse meat in Italy, *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63:48-53.
- Pozio E., La Rosa G., Rossi P. and Murrell D. (1989). New taxonomic contribution to the genus *Trichinella* Railliet 1895. I. Biochemical identification of seven clusters by gene-enzyme systems. In: ICT7 trichinellosis. C.E. Tanner (Ed) CSIC Press Madrid, Spain. Pp. 76-82.
- Pozio E., La Rosa G., Rossi P., Murrell D. and Lichtenfels. J. F. (1992a). Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology*, 78(4): 654-659.
- Pozio E., La Rosa G., Rossi P. and Murrell D. (1992b). Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology*, 78(4): 647-653.
- Pozio E., Varese P., Gómez-Morales M. A., Croppo G. P., Pelliccia D. and Bruschi F. (1993). Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(4): 568-575.
- Pozio E., Tamburrini A., Sacchi L., Gomez-Morales A., Corona S., Gofredo E. and La Rosa G. (1997). Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. *International Journal for Parasitology*, 27(12):1613-1621.
- Pozio E. (1998). Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. *Parasitology Today*, 14(1): 35-38.
- Pozio E., Celano G. V., Sacchi L., Pavia C., Rossi P., Tamburrini A., Corona S. and La Rosa G. (1998a). Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in muscles from a naturally infected horse. *Veterinary Parasitology*, 74:19-27.
- Pozio E., Sacchi D., Boni P., Tamburrini A., Alberici F. and Paterlini F., (1998b). Human Outbreak of Trichinellosis associated with the consumption of horsemeat in Italy. *Eurosurveillance*, 3(8-9):85-86.

- Pozio E., Owen I.L., La Rosa G., Sacchi L., Rossi P. and Corona S. (1999a). *Trichinella papuae* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *International Journal for Parasitology*, 29:1825-1839.
- Pozio E., Paterlini F., Pedarra C., Sacchi L., Bugarini R., Gofredo E. and Boni P. (1999b). Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *Journal of Helminthology*, 73: 233-237.
- Pozio E. (2000). Is horsemeat Trichinellosis an emerging disease in the EU? *Parasitology Today*, 16(6):266.
- Pozio E. and La Rosa G. (2000). *Trichinella murrelli* n. sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of north america. *Journal Parasitology*, 86(1):134-139.
- Ramis A. (1985). Current problems of epidemiology and epizootiology of trichinellosis. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 6th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Kim Ch. W. Ed. The State University of New York Press Albany, New York, USA. Pp. 190-200.
- Ramis A. (1988). Studies on some epizootiological and epidemiological problems of trichinellosis in Poland. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 370-375.
- Ramis A. and Balicka A. (1994). Remarks on horse trichinellosis in Poland. *Wiadomosci Parazytologiczne* 40(4): 381-399.
- Ranque S., Faugere B., Pozio E., La Rosa G., Tamburrini A., Pellissier, J. F. and Brouqui. P. (2000). *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5):543-547.
- Rodriguez-Macias R. (1986). Frecuencia de *Trichinella spiralis* en cerdos sacrificados en el rastro municipal de la ciudad de Puebla por el método modificado de digestión gástrica artificial. Tesis. Escuela Superior de Medicina Veterinaria y Zootecnia A.C., Puebla, Pue.
- Ruitenber E. J., van Knapen F. and Elgersma A. (1983). Incidence and control of *Trichinella spiralis* throughout the world. *Food Technology*, 37: 98.
- Sacchini D., Donisi A., Paolillo F., Ruggeri A., Biagini M. and Alberici F. (1998). Aspectti clinici ed epidemiologici di una epidemia da *Trichinella spiralis* occorsa in Piacenza nel febbraio 98. *Parassitology*, 1998, 40 (S1):161.
- Salinas-Tobón M. R., Martínez-Marañón R., Velasco-Castrejón O.

- and Chapa-Ruiz M. R. (1994a). Serological analysis of human trichinellosis cases occurred in Mexico during the period of 1984-1990 by standardized ELISA assay. In: Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W. C., Pozio E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 491-496.
- Salinas-Tobón M. R., Chapa-Ruiz M. R. and Ortega-Pierres M. G. (1994b). Evaluation of *Trichinella spiralis* surface antigens from muscle larva adult and newborn larva for the diagnosis of human trichinellosis. In: Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W. C., Pozio E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 365-371.
- Salinas-Tobón M. R., Valdez-Cruz C., Chapa-Ruiz M. R. and Ortega-Pierres M. G. (1994c). Longitudinal analysis of the human response to *Trichinella spiralis* antigens by ELISA and Western Blot assays. In: Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W. C., Pozio E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 373-379.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Pp E3-7.
- Secretaria de Salubridad (1998). <http://www.ssa.gob.mx>
- Serrano F. J., Pérez-Martín J. E., Reina D., Navarrete I. and Kapel C.M.O. (1999). Influence of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. Journal of Helminthology, 73:251-254.
- Sohn W. M., Kim H. M., Chung, D.I. and Yee S.T. (2000). The first human case of *Trichinella spiralis* infection in Korea. Korean Journal of Parasitology, 38(2):111-115.
- Silberstein D. S. and Despommier D. D (1985). Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to perified antigens. Science, 227: 948.
- Soulé C., Dupouy-Camet J., Ancelle T., Gillet J. P. and Collobert C. (1988). *Trichinella spiralis* larvae in muscles of experimentally infected horses in relation to the antibody response. In: Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 275-280.
- Soulé C., Dupouy-Camet J., Georges P., Ancelle T., Gillet J. P., Vaissaire J., Delvigne A. and Plateau, E. (1989). Experimental trichinellosis in horses: biological and parasitological

- evaluation. *Veterinary Parasitology*, 31:19-36.
- Soulé C., Dupouy-Camet J., Georges P., Fontaine J. J., Ancelle T., Delvigne A., Perret C. and Collobert C. (1993a). Variations biologiques et parasitaires chez des chevaux infestés et réinfestés par *Trichinella spiralis*. *Veterinary Recherche* 24: 21-31.
- Soulé C., Candolfi E., Dupouy-Camet J., Perret C. and Collobert C. (1993b). *Trichinella spiralis* circulating antigens and antibodies in experimentally infected horses. In: *Trichinellosis: Abstract of the 8th International Conference on Trichinellosis*. Orvieto, Italy, Pp 141.
- Soulé C., Guillou, J. P., Dupouy-Camet J., Vallet C. and Pozio E. (1993c). Differentiation of *Trichinella* isolates by polimerase chain reaction. *Parasitology Research*, 79(6):461-465.
- Soulé C., Guillou, J. P., Vallet C., Perret C. and Calamel M.. *Trichinella spiralis* larvae detected by PCR in the blood of an experimentally infected horse. (1994) In: *Trichinosis: Proceedings of the 8 th Int. Conf. on Trichinellosis*. Ed. by Campbell W. C., Pozio. E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanita Press Rome, Italy, Pp. 101-104.
- Smith, H. J. and Snowdon K. E. (1987). Experimental *Trichinella* infections in ponies. *Canadian Journal Veterinary Research*, 51:415-416.
- Stewart G. (1983). Pathophysiology of the muscle phase. In: "*Trichinella* and trichinosis". Ed. W. C. Campell. Plenum New York/London. Pp 241-264.
- Takahashi Z., Wu D. and Nagano I. (1997). PCR primers to detect genomic DNA of *Trichinella*. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp. 275-277.
- Touratier L. (1991). Prévention et surveillance de la trichinellose. In: Soule C., et Dupouy-Camet J. Ed. "La trichinellose une zoonose en évolution", CNEVA-OIE Ed. Paris Francia. Pp. 211-270.
- Uparanukraw P. and Morakote N. (1997). Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*, 83:52-56.
- Ursell P. C., Habib, A. and Babchick O., Rottolo R., Despommier D. and Fenoglio J. (1984). Myocarditis caused by *Trichinella spiralis*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 108:4-5.
- van Knapen F., Franchimont J. H., Ruitenberg E. J., Andre P., Baldelli

- B., Gibson T. E., Gottal C., Henriksen S. A., Köhler G., Ronéus O., Skovgaard N., Soule C., Strickland K. L. and Taylor S. M. (1981). Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology*, 9: 117-123.
- van Knapen F., Franchimont J. H., Ruitenbergh E. J., Andre P., Baldelli B., Gibson T. E., Henriksen S. A., Köhler G., Ronéus O., Skovgaard N., Soule C., Strickland K. L., Taylor S. M., Thomsen D. U. and Wolff, F. (1984). Comparison of three methods for detection of prolonged experimental Trichinellosis in pigs. *Veterinary Parasitology*, 16: 167-171.
- van Knapen F. and Franchimont J. H. (1988). *Trichinella spiralis* infection in horses. In: Trichinellosis: Proceedings of the 7th International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández A. R. and Bolas-Fernández F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid, Spain. Pp. 376-381.
- Vega-Alarcón N. and Romero V.A. (1992). Frecuencia de *Trichinella spiralis* en cerdos sacrificados en el rastro ABC de los reyes la Paz Estado de México utilizando dos técnicas de diagnóstico. Memorias. In: II Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. A. C. Universidad Veracruzana, México.
- Virga A., Gomez-Morales M. A., Croppo G. P. and Pozio E. (1994). Specificity of ELISA test in the diagnosis of equine trichinellosis. In: Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W. C., Pozio E. and Bruschi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 387-390.
- Voigt W. P., Noeckler K., Freischem B., Herinksen S. A. van Knapen F., Martínez-Fernández A., Pfeiffer G., Pozio E., Reuter G., Ring, Ch., Soule C. and Weiss H. (1997). Detection of low levels of *Trichinella spiralis* in experimentally infected horses. In: Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis. Edited by Ortega-Pierres M. G., Gamble R., van Knapen F. and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México, D.F. Pp. 629-634.
- Wang, Z. Q., Cui J., Wu, F., Mao F. R. and Jin X. X. (1998). Epidemiological clinical and serological studies on trichinellosis in Henan Province China. *Acta Tropical*, 71(3):255-68.
- Wassom D. L., Wisnewski N., McNeil M. and Grieve R. B. (1994). Immunodiagnosis of *Trichinella* infection: use of unique carbohydrate epitopes as target antigens. In: Trichinellosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W. C., Pozio E. and Bruschi F. Ed.

- Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. Pp. 295-298.
- Wisnewski N., McNeil M., Grieve R. B. and Wassom D. L. (1993). Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(1): 25-36.
- Wu Z., Nagano I., Fukumoto S., Saito S., Yamaguchi T., Pozio E. and Takahashi Y. (1997). Polymerase reaction primers to identify *Trichinella spiralis* or *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology International*, 46: 149-154.
- Wu Z., Nagano I. and Takahashi Y. (1998a). Differences and similarities between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* in morphology of stichocyte granules peptide maps of excretory and secretory (E-S) products and messenger RNA of stichosomal glycoproteins. *Parasitology*, 116:61-66.
- Wu Z., Nagano I. and Takahashi Y. (1998b). The detection of *Trichinella* with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glycoproteins. *Parasitology*, 117: 173-183.
- Wu Z., Nagano I., Pozio E. and Takahashi Y. (1999). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology*, 118:211-218.
- Yépez-Mulia L., Arriaga C., Peña M. A., Gual F. and Ortega-Pierres M. G. (1996). Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City Zoo. *Veterinary Parasitology*, 67: 237-246.
- Yépez-Mulia L., Arriaga C., Viveros N., Adame A., Benitez E. and Ortega-Pierres M. G. (1999). Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. *Veterinary Parasitology*, 81:57-68.
- Zarlenga D. S. and Dame J. B. (1992). The identification and characterization of a break within the large subunit ribosomal RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 281-290.
- Zarlenga D. S., Aschenbrenner A. R. and Lichtenfels J.R. (1996). Variations in microsatellite sequences provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*. *Journal of Parasitology*, 82:534-538.
- Zarlenga D. S., Chute B. M., Martin A. and Kapel C.M.O. (1999). A Multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of

Trichinella. International Journal for Parasitology, 29:1859-1867.

Zimmerman W.J. (1983). Surveillance in swine and other animals by muscle examination. In: Campbell W.C.(Ed), *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press New York, pp 515-528.