



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DEL USO POTENCIAL DEL PCR EN EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE TRIQUINELOSIS EQUINA.

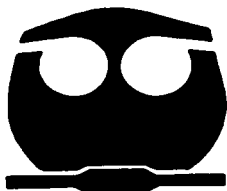
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

G O N Z A L E Z L I M O N E D I T H

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D.F.



2002

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

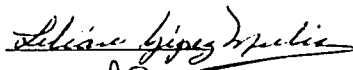
Presidente	Prof. ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS
Vocal	Prof. MAITE ASTIGARRAGA ZAVALAETA
Secretario	Prof. LILIAN YÉPEZ MULIA
1er. Suplente	Prof. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES
2º. Suplente	Prof. MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA

Sitio donde se desarrolló el tema

**Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias
Laboratorio de Parasitología. Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social**

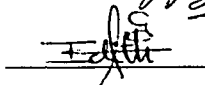
Asesor del tema:

DRA. LILIAN YEPEZ MULIA



Sustentante:

GONZALEZ LIMON EDITH



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Por haberme brindado la oportunidad de permanecer en su laboratorio y trabajar con ella. Por toda la confianza, dedicación y paciencia que me tuvo, además de todos sus consejos que desinteresadamente me dio, los cuales fueron de gran ayuda para poder lograr la realización de éste trabajo. Mil Gracias.

A mis profesores de la facultad.

A ustedes, por que me brindaron conocimiento, amistad y consejos durante toda la carrera. Gracias.

A mis amigos.

Blanca, Rocío, Andrea, Sonia, Vianey, Antonia, Julieta, Victor, Armando, Sergio, a ustedes les agradezco él haberme brindado su valiosa amistad, la cuál espero que perdure por muchos años. Gracias por todos aquellos momentos maravillosos que hemos pasado juntos.

A los compañeros de laboratorio

Bety, Noemí, Fernando, Amparo, Jesús, Rosita, Norma, Hilda que me facilitaron las herramientas para poder realizar mi trabajo, así como su amistad. Gracias.

A todos los que trabajan en la UIMEIP-Pediatría que me permitieron permanecer en esta unidad y así llevar acabo la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres

Lidia y Crescencio, les agradezco por todo el esfuerzo, sacrificio, apoyo y dedicación que me brindaron para que pudiera llegar a tener una carrera y de esta forma pudiera realizar mi sueño de ser una profesionista. No los defraudare. Los quiero.

A mi hermana

Mary por toda la paciencia que me ha tenido y por aguantarme. Te quiero mucho hermana.

A mis abuelos

Isabel y Julian, que dios los tenga en su santo reino, a ustedes que fueron como mis segundos padres, les dedico este trabajo, gracias por su gran amor y apoyo que siempre me brindaron para que yo pudiera salir adelante en la vida. Por siempre estarán en mi corazón.

A mi familia

A todos mis tíos y primos por que siempre me demostraron cariño, confianza e interés por mi persona, además siempre en todo momento me apoyaron dándome alientos para continuar con mis estudios. Gracias.

A Luis Felipe

A Tí por que me brindaste amor, cariño, amistad y por la comprensión paciencia y los bellos momentos que hemos compartido juntos. Te quiero.

INDICE

	Página
1. ABREVIATURAS	i
2. INDICE DE FIGURAS	ii
3. INDICE DE TABLAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
- Taxonomía	4
- Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	5
- Fase entérica	7
- Fase parenteral	7
- Manifestaciones clínicas	10
- Periodo intestinal	10
- Periodo de migración de las larvas y penetración a células musculares.	11
-Periodo de estado o de convalecencia.	11
- Diagnóstico de la triquinelosis.	13
5. ANTECEDENTES	17
6. JUSTIFICACIÓN	29
7. OBJETIVO GENERAL	31
8. OBJETIVOS PARTICULARES	31
9. MATERIAL Y METODOS	32
- Obtención de larvas musculares (LM) de <i>T. spiralis</i> por digestión artificial y mantenimiento del ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	32
- Obtención de larvas recién nacidas (LRN)	32
- Infección experimental en ratones de la cepa Balb/c	33
- Obtención de muestras de caballo de rastro	33
- Extracción de ADN mediante QIAamp DNA Mini kit	34
- Extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.	35
- Amplificación del ADN de <i>T. spiralis</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los iniciadores pPRA	36
10. RESULTADOS	39
11. DISCUSIÓN	51
12. CONCLUSIONES	57
13. APÉNDICE	58
14. BIBLIOGRAFÍA	59

1. ABREVIATURAS

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
p.i.	Post-infección
TIF	Tipo inspección federal
CE	Comunidad Europea
LPG	Larva por gramo
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
IET	Inmunolectrotransferencia
E/S	Excreción/Secreción
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
Kb	Kilobases
Pb	Pares de bases
KDa	Kilodaltons
mm	milímetro
g	gramo
ng	nanogramo
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
h	hora
min	minuto
s	segundo
mM	milimolar
μ m	micras
μ g	microgramo
μ L	microlitros

2. INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida silvestre.	2
Figura 2. Ciclo de vida doméstico.	3
Figura 3. <i>Trichinella spiralis</i> (Morfología). A. Adulto macho. B. Hembra adulta. C. Larva muscular. D. Larva Recién Nacida.	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	9
Figura 5. Célula nodriza.	10
Figura 6. Principales signos clínicos de infección por triquinelosis.	12
Figura 7. Cinética de la producción de anticuerpos contra antígenos de larvas musculares de <i>T. spiralis</i> por ELISA.	23
Figura 8. Posición de los iniciadores sobre la secuencia repetida de 1.6 Kb de <i>T. spiralis</i> .	25
Figura 9. Análisis de pureza e integridad del ADN de sangre de ratón infectado con 500 LM de <i>T. spiralis</i> , colectada a diferentes días después de la infección, empleando el kit QIAamp.	39
Figura 10. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando diferentes concentraciones de ADN obtenido de LRN de <i>T. spiralis</i> .	41
Figura 11. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando diferentes concentraciones de ADN obtenido de sangre de ratón salpicada con 2000 LRN de <i>Trichinella spiralis</i> .	42
Figura 12. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) obtenidos con 500 ng de ADN de sangre de ratones infectados con <i>Trichinella spiralis</i>	

-
- colectada a diferentes días después de la
infección (p.i.). 43
- Figura 13. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de
la Polimerasa (PCR) empleando 500 ng de ADN de
algunas muestras de sangre obtenidas de caballos de
rastro empleando el kit QIAamp sin salpicar ò
salpicando con ADN de LRN purificada. 46
- Figura 14. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de
la Polimerasa (PCR) obtenidos con ADN de algunas
muestras de sangre de caballo de rastró extraído
de acuerdo a lo recomendado por Soulé y cols (1993). 47
- Figura 15. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de
la Polimerasa (PCR) obtenidos con ADN de algunas
muestras de sangre de caballo de rastró extraído
de acuerdo a lo recomendado por Soulé y cols (1993). 48

3. INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Brotes de triquinosis humana en Europa relacionados con el consumo de carne de caballo.	18
Tabla 2. Músculos de predilección de <i>Trichinella spp</i> en caballos infectados experimentalmente.	20
Tabla 3. Resultados de investigaciones realizadas en varios países para la detección de <i>Trichinella</i> en carne de caballo infectada naturalmente con el parásito.	22
Tabla 4. Resultados del análisis de muestras de suero, diafragma, lengua y sangre de caballo de rastro TIF y del Rastro Rural realizadas por ELISA, Digestión artificial (DA) y PCR.	50

4. INTRODUCCIÓN

Los nemátodos son organismos multicelulares que incluyen a la mayoría de los patógenos más complejos de amplia distribución geográfica, que son de interés médico y veterinario ²⁶. En este grupo de organismos se encuentra clasificado el parásito del género *Trichinella*.

Trichinella spiralis, fue descubierta como larva enquistada en los músculos de cadáveres humanos autopsiados en Londres por Peacock (1828). Poco después se registraron otros casos en Europa y Norteamérica. Von Siebold (1844) y Dujardin (1845) sospecharon que el parásito era el estadio larvario de un nematodo. Joseph Elidí (1845) de Filadelfia, encontró quistes en la carne de cerdo e hizo notar su semejanza con los hallados en el hombre. Las investigaciones de Leuckart (1855-1860) y De Virchow (1859-1860)¹³ demostraron que estas formas enquistadas se convierten en gusanos adultos en pocos días cuando se administran a animales de experimentación y que las hembras, en la pared del duodeno, depositan larvas vivas que emigran a los músculos para enquistarse en ellos.

La triquinelosis es la enfermedad causada por parásitos del género *Trichinella*, la cual es cosmopolita, zoonótica de amplia distribución mundial, que se desarrolla en animales carnívoros – incluyendo roedores y seres humanos-. En la actualidad tiene un impacto significativo sobre la economía de los países afectados, debido a razones de salud pública, socioeconómicas y ocupacionales ^{29, 36, 39, 49, 50}.

Esta parasitosis ha cobrado importancia en años recientes ya que en varios países, la fuente de transmisión no ha sido controlada adecuadamente.

carne de cerdo cruda o mal cocida infectada con la larva muscular de *Trichinella*, sin embargo existen casos de triquinelosis relacionados al consumo de carne de oso, zorra, vacas, ovejas, cabras, entre otros ^{7, 37, 58}.

En algunas regiones, la triquinelosis se presenta como pequeños brotes, después de la ingestión de carne de animales de caza infectada, como ha ocurrido en EUA y en África. Este tipo de transmisión constituye el ciclo de vida silvestre de *Trichinella* (Figura 1). Sin embargo, desde el punto de vista médico el ciclo de vida doméstico del parásito es más importante, en donde la triquinelosis es primariamente una enfermedad de seres humanos y de cerdos, si bien la rata gris juega un papel importante en la transmisión de la enfermedad al alimentarse con los cadáveres de otras ratas ó animales infectados (Figura 2).

Recientemente se ha demostrado que los caballos, a pesar de que no son carnívoros, también pueden tener triquinelosis y son potencial fuente de infección para el hombre, en lugares donde su carne se emplea para consumo humano ⁵⁸.

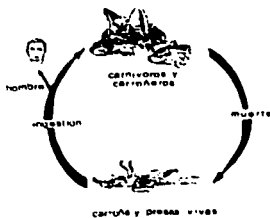


Figura 1. Ciclo de vida silvestre

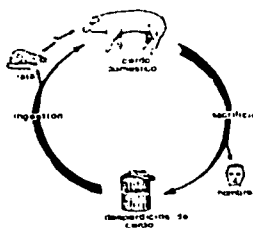


Figura 2. Ciclo de vida doméstico

En México, la triquinosis puede ser más frecuente de lo que se piensa si se toma en cuenta que de un total de 2200 autopsias efectuados por diversos autores de 1939 a 1974 mostraron una frecuencia de triquinosis del 4.2 al 12.5% . Por otro lado, de 1978 a 1995 se ha informado oficialmente de 25 brotes, que afectaron a un total de 635 individuos. En la mayor parte de los casos, el origen de la infección fue carne de puerco en diferentes preparaciones, especialmente chorizo. Las zonas endémicas reconocidas en nuestro país son Chihuahua, Estado de México, Jalisco y Zacatecas. Sin embargo, Zacatecas es uno de los estados que aparentemente tiene una mayor frecuencia de la enfermedad ya que en el período de 1978 a 1988 se informaron 166 casos, de los cuales 7 pacientes fallecieron ¹².

TAXONOMIA.

Trichinella es un helminto que pertenece al phylum Nematoda donde se encuentran agrupados otros organismos parásitos de importancia médica, como *Ascaris sp.*, *Onchocerca sp* y *Trichiuris sp.*

Owen, en 1835 clasificó a este organismo como se enlista a continuación:

Reino	Animal
Superphylum	Aschelminthes
Phylum	Nematoda
Clase	Adenoforea
Orden	Enoplida
Familia	Trichinellidae
Género	<i>Trichinella</i>

Los parásitos del género *Trichinella* presentan una gran variabilidad genética, reflejándose en la epidemiología, biología, huéspedes, zoogeografía, patología y aspectos clínicos de la enfermedad.

Inicialmente en el género *Trichinella* se consideraba una sola especie: *T. spiralis*, sin embargo se ha demostrado que existen varias especies y variantes geográficas. Estudios realizados por Pozio y colaboradores en 1992³³, describieron mediante un análisis isoenzimático de aislados de 5 continentes, 8 genotipos de *Trichinella* (T1-T8) que corresponden a 5 especies: (T1)-*Trichinella spiralis*, (T2)-*Trichinella nativa*, (T3)-*Trichinella britovi*, (T4)-*Trichinella pseudospiralis*, (T7)-*Trichinella nelsoni* y los genotipos T5, T6 y T8. Una nueva especie no-encapsulada del género *Trichinella* fue detectada en 5 cerdos domésticos y 6 jabalís de una área remota de Papua Nueva Guinea. Estudios morfológicos, biológicos y moleculares

mostraron que se trataba de una nueva especie nombrada *Trichinella papuae* ³⁴. La identificación y clasificación de la especie más reciente es *Trichinella murrelli* que anteriormente se clasificó como genotipo T5, que se identificó en 32 aislados de animales silvestres de la región Neártica de América del Norte ³⁸. Adicionalmente, se identificó otro genotipo, el T9 a partir de aislados obtenidos en Japón que inicialmente eran considerados *T. britovi*, esto debido a resultados de un estudio por RFPL (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) obtenidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y a la enzima de restricción SspI y el gen que codifica la proteína de excreción/secreción de 43 KDa⁵⁶. Actualmente se reconocen siete especies del género *Trichinella* y tres genotipos ²².

CICLO DE VIDA DE *Trichinella spiralis*.

El ciclo de vida (Figura 4) de este parásito presenta dos fases: una fase entérica donde el parásito pasa por cuatro mudas hasta llegar a convertirse en adulto y la fase parenteral, que incluye la larva recién nacida y la larva muscular enquistada.

Las características biológicas de *T. spiralis* son poco comunes, ya que un solo individuo sirve tanto de huésped definitivo como de huésped intermediario y la larva y los adultos se localizan en diferentes partes del huésped.

Trichinella spiralis difiere de otros parásitos helmintos en que las hembras son ovovíparas. Los machos miden de 1.4 a 1.6 mm de largo por 40 µm de diámetro y son más delgados en el extremo anterior que en el posterior. El esófago está rodeado por células denominados esticocitos, las que tienen

una gran actividad secretora. Las hembras tienen cerca del doble de tamaño (3 a 4 mm) por $60\ \mu\text{m}$ de diámetro, que los machos y tienen también afilado el extremo anterior. El útero es simple y en las hembras grávidas, este órgano está lleno de huevecillos en desarrollo en su porción anterior, en tanto que la porción posterior contiene las larvas maduras plenamente desarrolladas. La larva muscular (LM) mide $400\ \mu\text{m}$ y es sexualmente diferenciada y la larva recién nacida (LRN) que es el estadio más pequeño y menos diferenciado mide $100\ \mu\text{m}$ de largo y $6\ \mu\text{m}$ de diámetro ¹⁵(Figura 3).



Figura 3. *Trichinella spiralis* (Morfología)¹³. A. Adulto macho. B. Hembra adulta. C. Larva muscular. D. Larva Recién Nacida.

FASE ENTERICA

La infección en el huésped se inicia cuando se ingiere carne infectada con larvas musculares (enquistadas) ^{18,19,32}, las que una vez liberadas del tejido muscular por acción del jugo gástrico, invaden el intestino y en las células epiteliales de éste se lleva a cabo el crecimiento, desarrollo y maduración de los parásitos adultos.

En la mucosa intestinal, mudan por lo menos una vez e inician el proceso de diferenciación sexual que se completa en un término aproximado de 24 h. La copulación se lleva a cabo a las 48 h en la mucosa duodenal y por lo general el macho muere poco después. La hembra anida en la mucosa y submucosa intestinal y entra en los conductos linfáticos llegando a los nódulos linfoides mesentéricos. Durante y después de esta migración nacen cerca de 1500 larvas en un período de tres a cinco semanas. Generalmente la hembra muere o es expulsada mediante mecanismos inmunitarios.

FASE PARENTERAL

La mayoría de las larvas recién nacidas atraviesan la mucosa intestinal y son llevadas por el sistema hepático portal a través del hígado, luego a corazón, pulmones y llegan al sistema arterial para distribuirse por todo el cuerpo; se alojan principalmente en los músculos esqueléticos, sobre todo aquellos que son pobres en glucógeno, pero con gran actividad, como diafragma, intercostales, cuádriceps, lengua, maceteros, orbiculares y otros. Esto suele ocurrir a partir del séptimo día. Hacia la tercera semana, las larvas después de varias mudas alcanzan el cuarto estadio de desarrollo donde maduran para convertirse en larva muscular, etapa en que son infectantes y repetirán el ciclo si son ingeridas por otro huésped.

Cuando las larvas recién nacidas alcanzan el músculo esquelético penetran la célula muscular y empiezan a crecer, adquieren forma de espiral y comienzan a ser rodeadas por leucocitos. La larva absorbe sus nutrimentos de las células musculares que la contienen. La célula muscular infectada se transforma e incrementa su longitud hasta cerca de 1mm hacia las ocho semanas en una estructura conocida como célula nodriza (Figura 5). La transformación a célula nodriza se lleva acabo en aproximadamente 20 días a partir de la entrada del parásito. Cada célula nodriza tiene un plexo de vénulas que ayudan al transporte de nutrientes para el desarrollo de las larvas. La transformación de la célula muscular a célula nodriza involucra la desorganización y desaparición final de todos los componentes musculares específicos como son las miofibrillas, así como agregados mitocondriales parcialmente disfuncionales, alargamiento del núcleo, hipertrofia del glicocálix en un revestimiento externo de colágena y angiogénesis ¹⁶. Una vez que la larva ha completado su desarrollo, la célula nodriza puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero (meses hasta años) y no calcificarse, sin embargo el proceso de calcificación dependerá de los diferentes tiempos de la infección, así como de la especie del hospedero. Pero, el parásito sobrevivirá dentro de la célula nodriza el tiempo suficiente para asegurar la dispersión de los animales infectados dentro del ecosistema, así como la distribución de la larva muscular a otros animales carnívoros, ya sea por depredación, por actos de rapiña o canibalismo ⁵⁸.

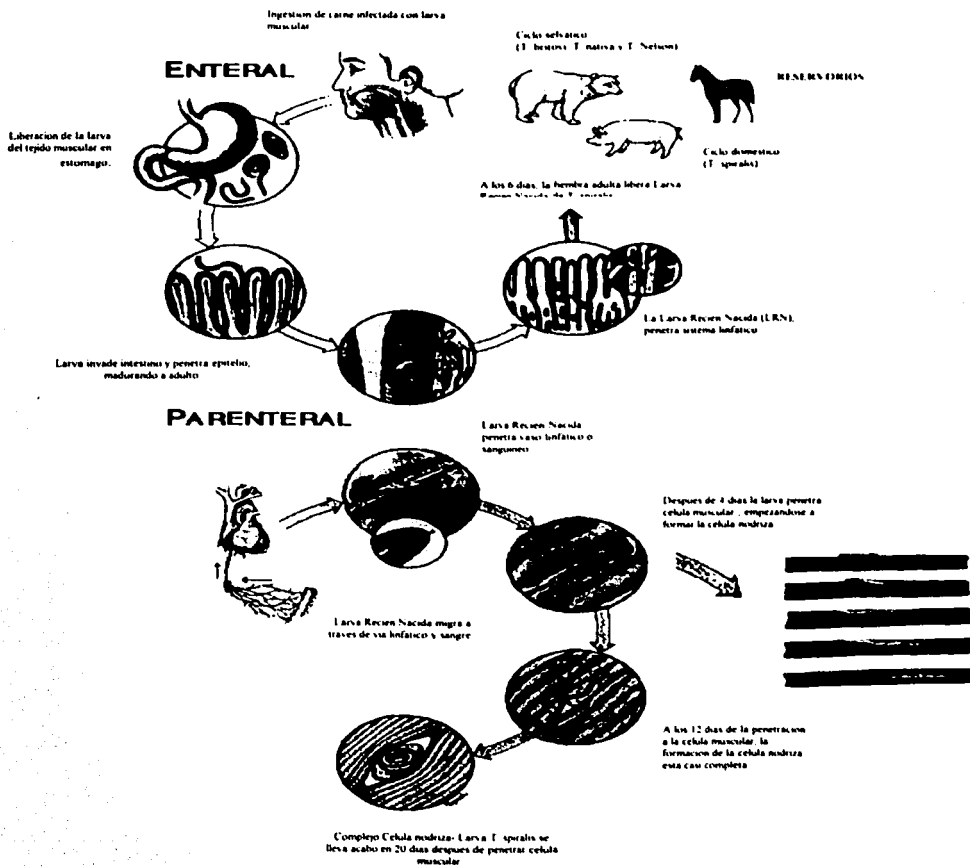


Figura 4. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.

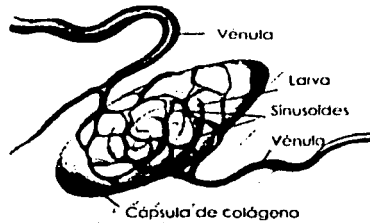


Figura 5. Célula nodriza.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

En el hombre como en animales de experimentación, el curso clínico de la triquinosis depende mucho de la intensidad de la infección. Para fines prácticos se han considerado tres períodos:

PERIODO INTESTINAL

Los primeros síntomas aparecen en un lapso de 12 a 48 h después de haber ingerido la carne infectada y consiste sobre todo en manifestaciones gastrointestinales como dolor abdominal, náusea, vómito, y diarrea en el hombre, que generalmente se diagnóstica como gastroenteritis o intoxicación alimentaria; en animales se presenta pérdida de fluido gastrointestinal y signos como mala absorción que deben a la presencia de organismos adultos en el intestino del huésped.

PERIODO DE MIGRACION DE LAS LARVAS Y PENETRACION A CELULAS MUSCULARES.

Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas después de la infección. Durante la migración las larvas dañan los vasos sanguíneos, lo que provoca edemas que es más evidente en cara y párpados. Las larvas migratorias pueden causar también neumonía, encefalitis, nefritis, peritonitis, etc. Puede ocurrir la muerte en esta fase por miocarditis, aunque las larvas en general no penetran las células miocárdicas. Es característico de esta etapa el dolor muscular, que puede ser incapacitante.

PERIODO DE ESTADO O DE CONVALECENCIA

Llega a durar algunos meses e incluso años. En esta fase las larvas se han establecido en las fibras musculares y se ha efectuado la formación de la célula nodriza. Los síntomas generales han desaparecido o disminuido considerablemente y sólo persiste dolor muscular que se hace evidente con el ejercicio.

Los principales signos clínicos relacionados con el tiempo de infección se presentan en la figura 6.

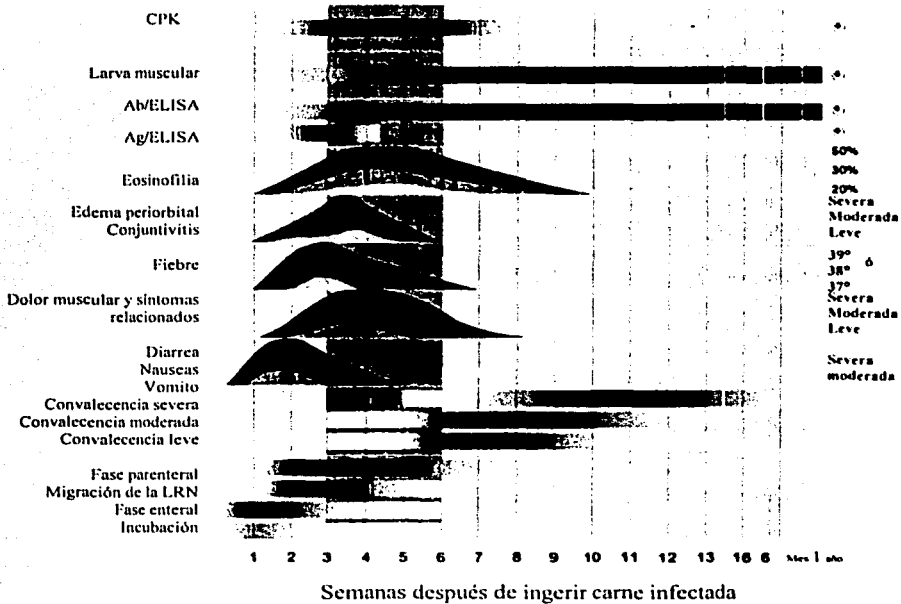


Figura 6. Principales signos clínicos de infección por trichinelosis ^{10,24,28}.



DIAGNOSTICO DE LA TRIQUINELOSIS

El diagnóstico clínico de esta enfermedad puede dificultarse debido a que los síntomas cuando se presentan son muchas veces confundidos con los de otras enfermedades. Sin embargo, entre estos la presencia de fiebre, dolor muscular intenso, edema periorbital, niveles elevados de creatinina, lactato deshidrogenasa, inmunoglobulina E, hipereosinofilia y leucocitosis, son de gran utilidad para el diagnóstico de la triquinosis ^{32, 41}.

El diagnóstico de certeza se efectúa mediante biopsia muscular, que se deberá tomar de los sitios más dolorosos.

Algunas de las pruebas serológicas que se han realizado en humanos para el diagnóstico de la triquinosis son: la hemaglutinación indirecta, fijación del complemento, reacción intradérmica, floculación de bentonita, Inmunofluorescencia indirecta, contrainmuno electroforesis, ELISA e inmunoelectrotransferencia (IET).

Actualmente en el diagnóstico de la triquinosis humana, el ensayo inmunoenzimático (ELISA), ha mostrado alta sensibilidad y especificidad. La IET es aún más específica y se puede emplear como una prueba confirmatoria. En el caso del ELISA se emplean principalmente antígenos específicos del parásito como son los antígenos de superficie y los de excreción/secreción de la larva muscular de *T. spiralis* que actualmente se denominan TSL-1 ⁵⁸.

Salinas-Tobón y colaboradores en 1996 ⁴², realizaron por ELISA el análisis de 22 muestras de suero colectadas de individuos que formaron parte de

un brote de triquinelosis en 1989, en Toluca, Estado de México, por ingerir chorizo. Estudiaron la respuesta de los anticuerpos contra antígenos TSL-1 purificados de LM de *T. spiralis*. En este estudio se definió la clase y subclase de anticuerpos con el objeto de mejorar la sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico. Los autores obtuvieron que 17/22 individuos presentaron síntomas clínicos y dieron positivos por ELISA, de los sueros positivos (17) en 13 se demostró la presencia del parásito por biopsia muscular, 4 fueron negativos en biopsia y los 5 restantes no presentaron síntomas y dieron negativos por ELISA. Los niveles de anticuerpos IgM y IgE fueron altos, de igual forma la respuesta de IgA por la semana 3 post-infección (p.i.) y el pico más alto es observado en las semanas 5 y 7 p.i., decreciendo lentamente a la semana 15 p.i. De forma contraria la respuesta IgG es baja a la semana 3 p.i., incrementándose a la 5 p.i. y alcanzando un máximo a la semana 15, permaneciendo así por arriba de la semana 57 p.i. Esta misma respuesta fue observada para todas las subclases de IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, por la semana 3 p.i., solo en el 75% de los individuos con triquinelosis se detectó IgA o IgG₃ y en el 98% se detectó IgM, IgG y IgG₂. Por lo tanto, los autores sugirieron que la detección de IgA y IgG₃ pueden usarse como indicadores de una infección temprana, así como para el diagnóstico y estudio seroepidemiológico de triquinelosis humana.

Así mismo, Chapa-Ruiz y colaboradores en el 2001¹¹, analizaron por ELISA la respuesta de anticuerpos contra el extracto soluble total de la etapa adulta de *T. spiralis* (TSE-A) durante las semanas, 3,4,5,7,12,15,37 y 57 p.i., de los 22 individuos mencionados anteriormente involucrados en el brote de triquinelosis ocurrido en el Estado de México. Este ensayo reveló que en individuos sintomáticos se detecta IgA y IgE en un 69 y 62%

respectivamente a la semana 3 p.i.; IgE y IgM en el 88 y 86% respectivamente a la semana 5p.i., IgM con 93% a la semana 7p.i. e IgE con aproximadamente un 100% de la semana 15 hasta la 57 p.i. En este estudio, se concluyó que la detección de IgA y IgE contra antígenos del adulto de *T. spiralis*, puede ser usado para el diagnóstico temprano de triquinosis humana, así como la detección de IgA y IgM contra TSE-A puede ser usado como marcador de la fase aguda de la infección por *T. spiralis*.

Por otro lado, en el diagnóstico de triquinosis porcina se emplean los métodos de triquinoscopia y la digestión artificial ⁶⁰. El método de digestión artificial es el más ampliamente usado en la inspección porcina en EU y países europeos. En este método se usa una muestra de 1g la cual se digiere en presencia de una solución de pepsina-HCl al 1%. Este método tiene una sensibilidad de detección aproximadamente de 3 a 5 larvas por gramo (LPG) de tejido y el uso de 5g de muestra incrementa la sensibilidad aproximadamente a 1LPG ^{23, 37}. Estudios realizados con cerdos, indican que la lengua y diafragma, son los tejidos de elección del parásito y la digestión artificial de estas preparaciones tienen la máxima sensibilidad de detección de la larva muscular ²¹.

En el caso del diagnóstico de triquinosis equina, el método de diagnóstico recomendado es la digestión artificial, sin embargo en este caso particular la baja sensibilidad del método ha contribuido a la ocurrencia de varios brotes de triquinosis humana en países Europeos ⁴⁰. En términos generales, los caballos presentan cargas parasitarias bajas por lo que la digestión artificial no ha sido lo suficientemente sensible para permitir la detección de todos los animales infectados ^{45, 46, 57}. La directiva

94/59/EEC de la Comunidad Europea, en 1994, recomendó incrementar de 1 a 5 gramos el peso mínimo de la muestra a analizar. Pueden combinarse muestras de varios caballos, pero el peso total de la muestra de carne no debe superar a los 100g para su análisis, por lo que pueden controlarse simultáneamente un máximo de 20 caballos. Así mismo, se recomienda que la muestra a analizar sea de los músculos de predilección por el parásito que en el caso del caballo son: masetero, lengua y diafragma. Por lo que se refiere a las carnes congeladas, no sometidas a este control obligatorio, las directivas europeas han definido las combinaciones de tiempo y temperatura que deben aplicarse de acuerdo con el grosor de la pieza ²⁵.

En cuanto a los ensayos serológicos, estos tampoco ofrece un diagnóstico sensible de la triquinelosis equina, principalmente por que los niveles de anticuerpos dirigidos contra el parásito son muy bajos, dificultándose la detección de infecciones tempranas y tardías ^{5, 37, 57}. Por lo que el uso de métodos serológicos para detectar caballos infectados con *Trichinella* sigue siendo un problema. Sofronic-Milosavljevic y colaboradores (2001)⁴⁴, mencionan que el problema para detectar *Trichinella* en suero de caballos infectados se debe principalmente por dos razones: 1) la rápida ausencia de anticuerpos en circulación después de la infección, y 2) la baja especificidad de antígenos de ES en caballos. Sin embargo, estos antígenos pueden tener una alta especificidad para la detección de los anticuerpos en humanos y cerdos infectados con el parásito.

Por lo anterior, en este caso en especial se requiere el empleo de métodos de diagnóstico más sensibles.

5. ANTECEDENTES

El consumo de la carne de cerdo ha sido considerado como la fuente más importante en la transmisión de la triquinelosis. Sin embargo, la importancia de carne de caballo como una fuente de infección de *Trichinella* ha sido reportado en años recientes, particularmente después de varios brotes de triquinelosis en Francia y Italia, los cuales involucraron un gran número de gente, causando algunas muertes ^{1, 2, 19, 27, 31, 35, 51}.

En 13 de los brotes más graves de triquinelosis humana ocurridos en Europa entre 1975 a 1998 (Tabla 1), se registraron cerca de 3300 personas infectadas y 5 decesos, atribuidos al consumo de carne de caballo infectada con larvas de parásitos del género *Trichinella* ^{1, 4, 9, 19}.

Los datos obtenidos en el seguimiento epidemiológico realizado por las autoridades sanitarias de países en donde se presentaron los primeros brotes, mostraron que éstos habían sido causados por el consumo de carne de caballo cruda ^{1, 51}. Sin embargo el parásito no se pudo detectar de manera directa en los caballos. Ancelle y colaboradores (1998b)³ realizaron estudios epidemiológicos para determinar la asociación entre varios factores y la enfermedad, mostrando una fuerte relación entre el consumo de carne de caballo y la triquinelosis humana en más de un brote. Además, se encontró por lo menos tres signos clínicos asociados a la enfermedad como son: fiebre, mialgia, edema facial y una fuerte eosinofilia (>1000 cel/mm³). El hábito culinario del consumo de carne de caballo cruda en las provincias de Francia y Italia, es una razón para ligar los brotes de triquinelosis humana en estos países con el consumo de este tipo de carne ^{9, 50}.

Tabla 1. Brotes de triquinosis humana en Europa relacionados con el consumo de carne de caballo.

Fecha	Lugar	No. de casos	Origen del caballo	Tipo de aislado	Referencia
1975	Italia	89	Europa oriental	T britovi	Mantovan y cols., 1980
1975	Francia	125	Polonia	ND	Motyka, 1976; Boireau y cols., 1979
1984	Italia	13	Europa Oriental	ND	Parravicini y cols., 1986
1985	Francia	431	Estados Unidos	T5 ^a	Ancelle y cols., 1988; Dick y cols., 1990
1985	Francia	642	Polonia ^a	T spiralis ^a	Quinet, 1987; Ancelle y cols., 1988
1986	Italia	>300	Yugoslavia o Polonia	T britovi ^b	Pozio y cols., 1988
1990	Italia	>500	Europa Oriental	T spiralis ^b	Pozio, 1991
1991	Francia	21	Estados Unidos	ND	Deystout y cols., 1991
1993	Francia	538	Canadá	T spiralis ^a	Ancelle y cols., 1993; Dupouy-Camet y cols., 1994
1994	Francia	7	México	T spiralis ^a	Maitlot y cols., 1997
1998	Francia	128	Serbia	T spiralis ^b	Haeghebaert y Maitlot, 1999
1998	Francia	407	Serbia	T spiralis ^b	Touratier y cols., 1999
1998	Italia	92	Polonia	T spiralis ^b	Pozio y cols., 1998b

Tomado de Boireau y cols., 2000.

ND= No determinado

^aLa identificación de la especie de *Trichinella* es de biopsias de humanos o de animales domésticos.

^b*Trichinella* recuperada de carne de caballo después del brote.

El origen de los caballos infectados ha sido de países de Europa Oriental, Canadá, E.U. y México (Tabla 1). En los brotes ocurridos de 1975 a 1994, la identificación de la especie de *Trichinella* involucrada se realizó por técnicas moleculares de biopsias de pacientes ó animales domésticos infectados. Las especies identificadas fueron: *Trichinella britovi*, *Trichinella spiralis* y T5, esta última actualmente fue identificada y clasificada como *Trichinella murrelli* ³⁸, presentándose en la mayoría de los casos *T. spiralis*.

A partir de 1985, se establecieron por la Comunidad Europea medidas de control muy estrictas para tratar de prevenir las infecciones en humanos, considerándose obligatoria la inspección por digestión artificial de la carne de caballo no sólo en los países consumidores sino también en los países exportadores de carne de caballo.

A la fecha no se conoce cómo se infectan los caballos, sin embargo experimentalmente ha sido posible infectarlos por vía oral, empleando diferentes especies de *Trichinella* y diferentes dosis de larvas musculares. Polidori y colaboradores (1989)³⁰ y Soulé y colaboradores (1989)⁴⁵ indican que en los caballos infectados experimentalmente hay un severo trastorno muscular, seguido por la presencia de un incremento de enzimas musculares (aldolasa, deshidrogenasa láctica (LDH), creatinfosfocinasa (CPK) y aspartato aminotransferasa (GOT)) en torrente circulatorio.

En el diagnóstico de triquinosis equina por el método de digestión artificial es importante considerar el músculo de predilección por el parásito (Tabla 2). A este respecto, Smith y Snowdon (1987)⁴³, realizaron la infección de 3 ponies infectándolos con una dosis de 1000, 5000 y 25000 LM de *T. spiralis* y observaron que la lengua, macetero y diafragma fueron los sitios de predilección de la LM. Los mismos resultados fueron obtenidos por Polidori y colaboradores (1989)³⁰, cuando infectaron a 3 y 2 caballos con 10000 LM de *T. spiralis* y *T. nelsoni* respectivamente. Así mismo, Soulé y colaboradores (1989)⁴⁵ observaron por digestión artificial y triquinoscopia, un mayor número de LM en lengua, con respecto al macetero, en 5 de 8 caballos infectados con 5000, 20000 y 50000 LM de *T. spiralis*. Sin embargo en uno de los caballos infectados con una dosis de 20000 LM, el macetero



tenía más LPG que la lengua y en otros dos animales el diafragma tenía más LPG que la lengua y macetero.

Tabla 2. Músculos de predilección de *Trichinella spp* en caballos infectados experimentalmente.

No de Caballos	Especie de <i>Trichinella</i>	Dosis (L.M)	Periodo de infección (Semanas p.L)	Músculo infectado de predilección	Referencia
9 (ponies)	<i>T. spiralis</i>	5000-10000	8-14	Diafragma, macetero	Wühl y cols , 1977
4	<i>T. britovi</i>	2000-20000	4-25	Lengua, mástil, macetero	Pampiglione y cols , 1978
3 (ponies)	<i>T. spiralis</i>	1000, 5000,25000		Lengua, macetero, diafragma	Smith y Snowdon, 1987
2	<i>T. spiralis</i>	30000, 75000	10, 20	Lengua, macetero, diafragma	Van Knapen y cols , 1987
3 y 2	<i>T. spiralis, T. nelsoni</i>	10000	24	Lengua, diafragma macetero	Polidori y cols , 1989
3 , 3 y 3	<i>T. spiralis</i>	5000, 20000, 50000	40	Lengua, macetero, diafragma	Soulé y cols , 1989
7	<i>T. spiralis</i>	20000	7-52	Macetero, lengua, diafragma	Soulé y cols , 1993*
2 y 2	<i>T. spiralis, T. britovi</i>	10000		Nd	Marin y cols , 1994
10	<i>T. spiralis</i>	5000	12-19	Lengua, diafragma, macetero (menor 5g)	Voigt y cols , 1998
12	<i>T. spiralis</i>	1000,4000	12	Lengua	Gamble y cols , 1996
		10000,40000		macetero	
1	<i>T. spiralis</i>	20000	50	Lengua, macetero, diafragma	Perret y cols , 2000
3	<i>T. spiralis</i>	30000, 40000	27	Lengua , diafragma	Yépez-Mulia y cols , 1999

Tratando de definir los músculos de predilección de *Trichinella*, Gamble y colaboradores (1996)²³, realizaron infecciones experimentales en caballos empleando 10000 y 40000 LM de *T. spiralis*. En ambos casos se detectaron por digestión artificial y triquinoscopia un mayor número de LM, en macetero comparado con lengua, mientras que animales infectados con 1000 o 4000 LM, la lengua presentaba un mayor número de larvas. En este estudio, se detectó que el tamaño de muestra óptimo para la detección del parásito fue de 5 ó 10g. Con respecto a lo anterior, se deduce que la



lengua es el sitio de predilección del parásito en infecciones con carga parasitaria baja, luego macetero, seguido por diafragma.

Recientemente, Pozio y colaboradores (1999b)³⁵, reportaron los sitios predilectos para el parásito en caballos infectados naturalmente que fueron detectados recientemente en Italia. La obtención de LM fue por digestión artificial, encontrándose que los músculos que presentaban un mayor número de larvas por gramo (LPG) fueron los de la cabeza como son: lengua, bucinator y macetero.

Como se mencionó anteriormente, la digestión artificial es el método de diagnóstico recomendado por la Comunidad Europea en la detección de triquinosis equina, sin embargo, miles de caballos de rastro han sido inspeccionados y sólo en unos cuantos se ha demostrado la presencia de *Trichinella*⁷.³²(Tabla 3). Lo anterior puede deberse a que la carga parasitaria en general es baja y la cantidad de carne analizada es poca, lo cual hace que este método no sea lo suficientemente sensible. A este respecto Arriaga y colaboradores (1995)⁶ digirieron artificialmente 40 g de diafragma de caballo de un rastro rural del Estado de México, pudiéndose detectar la presencia de *Trichinella* en 4/80 caballos (5% de positividad). El haberse aumentado el tamaño de la muestra, aumentó la sensibilidad del método, sin embargo resultó laborioso y demasiado costoso.

Cabe mencionar que el diafragma ha sido el músculo analizado en la mayoría de los caballos de rastro, lo cual pudiera haber influenciado los resultados obtenidos, ya que como se mencionó anteriormente, en equinos, la lengua es el tejido de predilección cuando la carga parasitaria es baja. La baja sensibilidad de este método directo se refleja en la ocurrencia de brotes en países europeos a pesar de que los caballos de

rastro hayan sido inspeccionados por digestión artificial desde 1985 (Tabla 1).

Tabla 3. Resultados de investigaciones realizadas en varios países para la detección de *Trichinella* en carne de caballo infectada naturalmente con el parásito.

Pais	Número de caballos	Método de diagnóstico	Año	Número de positivos	Número de brotes	Frecuencia de positivos	Referencia
Polonia	500000	DA	1984-1994	0	?	Muy bajos	Ramsz y Balicka, 1994
Bélgica	1577	DA	1986-1991	0	0	0	Borchgrave y cols., 1991
Suiza	106	DA y ELISA	1993	0	0	0	Jacob y cols., 1991
México	80	DA	1996	4	?	50/1000	Arriaga y cols., 1995
Francia	59600	DA	1996-1999	2	2	0.07/1000	Boireau (comunicación personal)
Bélgica	40164	DA	1997-1998	0	0	0	Geerts (comunicación personal)
Canadá	315000	DA	1995-1999	0	0	0	Gajadhar (comunicación personal)
Estados Unidos	60696	DA	1996-1999	0	0	0	Gamble (comunicación personal)
Italia	600000	DA	1996-1999	3	1	Muy bajo	Celano y cols., 1996, Pozio y cols., 1999, Pozio (comunicación personal)

DA = Digestión artificial

Tomado de Boireau y cols., 2000

Una alternativa en el diagnóstico de triquinosis equina son los métodos serológicos (ELISA, Inmunoelctrotransferencia (IET), Inmunofluorescencia indirecta (IIF)). Algunos estudios realizados con caballos provenientes de rastros, indican que es posible detectar anticuerpos dirigidos contra *Trichinella* en sueros de estos animales ^{8, 53, 54}. Sin embargo, en un estudio reciente realizado en caballos de un rastro rural en el Estado de México, en donde muestras de suero de 4 caballos de rastro encontrados positivos por digestión artificial, dieron valores negativos por ELISA aún a una dilución 1:20. Lo anterior pudiera explicarse a partir de resultados obtenidos de

infecciones experimentales, en donde se observa aumento en el nivel de anticuerpos específicos contra el parásito de la semana 5 a 7 p.i. seguido por un rápido decremento por la semana 11 p.i. y niveles de anticuerpos muy bajos entre la semana 17 a 24 p.i. ⁵⁷ (Figura 7). Es posible que los caballos infectados naturalmente albergaran una infección tardía (cuando ya el parásito se encuentra en músculo), donde los niveles de anticuerpos son bajos, por lo que el ensayo de ELISA resultó poco sensible.

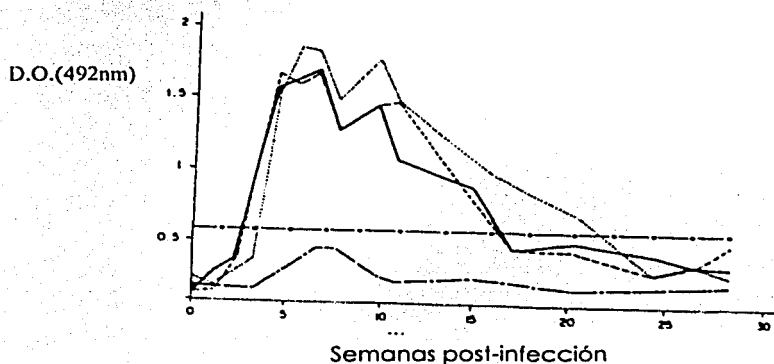


Figura 7. Cinética de la producción de anticuerpos contra antígenos de larvas musculares de *T. spiralis* determinados por ELISA ⁵⁷. Muestras de suero de tres caballos infectados experimentalmente con 40000 (---, —) ó 30000 (.....) de LM de *T. spiralis* y de un caballo no infectado, usado como control negativo (---), tomados a diferentes tiempos después de la infección y analizados por ELISA. El punto de corte (---) es calculado con los valores de densidad óptica (D. O.) de las muestras de suero del control no infectado más tres desviaciones estándar.

Resultados similares fueron obtenidos por Pozio y colaboradores (1997)³⁷, que indican que por ELISA no ha sido útil detectar anticuerpos contra *Trichinella*, ya que los niveles de anticuerpos pueden ser bajos aunque las larvas presentes en los músculos de los caballos aun sean infectivas. Los autores detectaron al parásito en muestras de músculo de caballo usando métodos parasitológicos, sin embargo los valores de ELISA usando productos de excreción/secreción de la LM del parásito fueron negativos. En este estudio se sugirió que la infección fue adquirida entre los 8 y 10 meses previamente, siendo los niveles de anticuerpos específicos en circulación muy bajos después de este tiempo de infección.

Estas evidencias sugieren la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico de triquinelosis equina que permitan la detección del parásito de manera sensible y específica.

A este respecto, el empleo de técnicas moleculares como la PCR puede ser una alternativa en el diagnóstico específico y sensible de la triquinelosis equina.

En años recientes la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido aplicada exitosamente para la amplificación de ADN de *Trichinella spiralis*, y se ha sugerido como un método útil en el diagnóstico de la triquinelosis porcina y equina ^{17, 20, 47, 52}. La ventaja de este tipo de técnica molecular es la determinación del material genético del parásito que indica la presencia precisa de éste en el hospedero, a diferencia del ELISA que sólo muestra la presencia de anticuerpos contra el parásito, pudiéndose tratar de una infección pasada. En el caso de triquinelosis equina, la PCR representa una alternativa para su diagnóstico tanto en la fase de

infección temprana (cuando la LRN se encuentra en sangre), como tardía, cuando los niveles de anticuerpos son bajos así como en infecciones con cargas parasitarias bajas que puedan pasar desapercibidas cuando se emplea el método de digestión artificial.

Así, se ha estudiado la especificidad de la PCR para detectar secuencias de ADN repetidas en *Trichinella* considerándose que aproximadamente el 42% de ADN genómico de *T. spiralis* consiste de este tipo de secuencias. Dupouy-Camet y colaboradores (1991)²⁰ aplicaron la PCR para la amplificación de la secuencia de ADN repetida de 1.6 Kb de *Trichinella spiralis*, la cual fue clonada en el plásmido pUC9 (pPra)(Figura. 8) . Los autores demostraron que empleando iniciadores específicos para esta secuencia denominados como pPra, es posible detectar el ADN de larvas de *T. spiralis* en músculo de ratones infectados experimentalmente, obteniéndose dos productos de amplificación específicos de 602 y 800pb y uno inespecífico de 230pb.

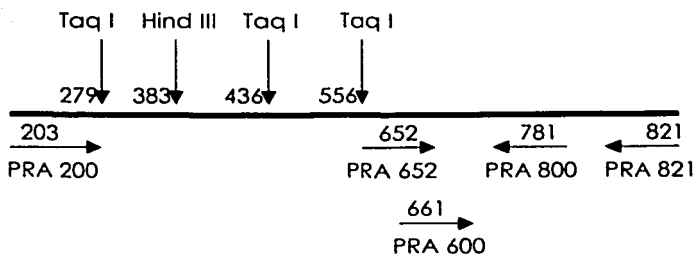


Figura 8. Posición de los iniciadores sobre la secuencia repetida de 1.6 Kb de *T. spiralis*.

Más tarde, Dick y colaboradores (1992)¹⁷ usaron la PCR para identificar aislados de *Trichinella*, empleando los iniciadores pPra, detectando hasta una larva en el tejido muscular de cerdos infectados experimentalmente con la LM del parásito, sin embargo no hubo amplificación del ADN geonómico de *Trichinella nativa*, en consecuencia se sugirió el empleo de estos iniciadores en el diagnóstico específico de infecciones producidas por *T. spiralis*.

Posteriormente, Soulé y colaboradores (1994)⁴⁷ usaron la PCR para detección de LRN de *T. spiralis* en la sangre de caballos infectados experimentalmente. En este estudio se colectaron muestras diarias de sangre a lo largo de 6 semanas después de la infección, obteniéndose el ADN y su posterior amplificación por PCR usando los oligonucleótidos pPra. Los fragmentos de amplificación específicos de 602pb y 800pb y el inespecífico de 230pb se observaron en los días 6 al 14 p.i., y episodios positivos del día 14 al 33 p.i., esto posiblemente por decremento del número de LRN en la sangre. Sin embargo en este mismo estudio al hacerse una reinfección con *T. spiralis*, no se observaron productos de amplificación en ningún día p.i., quizás debido a una reacción intestinal inmune, causando entonces una rápida expulsión del adulto ó destrucción de LRN.

Por otro lado, Arriaga y colaboradores (1995)⁶ identificaron la especie de *Trichinella* presente en caballos infectados naturalmente empleando PCR y utilizando los iniciadores oTsr1 y oTsr-4 descritos por Zarlenga y Dame (1992)⁵⁹, los cuales reconocen la región del rRNA de la subunidad grande de *Trichinella*. Usando los iniciadores mencionados es posible diferenciar *T. spiralis*, de especies silvestres, ya que en el caso de *T. spiralis*, se amplifica

un fragmento de 170pb, y de 130pb para genotipos silvestres de *Trichinella* (*T5* y *T. nativa*).

Más recientemente, Uparanukraw y Morakote. (1997)⁵² mediante la PCR amplificaron el ADN de las LRN de *T. spiralis* a partir de sangre de ratones infectados experimentalmente, usando los oligonucleótidos pPRA y los TsP49 que son derivados del gen P49 que codifica para un producto de excreción/secreción del parásito ⁴⁸. Con el empleo de los iniciadores pPra se observaron los fragmentos esperados y en el caso de los TsP49 solo se observó un fragmento específico de 0.85Kb que es observado en los días 5 y 9 p.i. únicamente.

Aun más recientemente, Viveros y colaboradores (2001)⁵⁵ realizaron un estudio en donde comparan la sensibilidad del método de la PCR contra un serológico (ELISA) y uno parasitario (digestión artificial), para el diagnóstico de triquinelosis equina. En este estudio se colectaron muestras de tejido de diafragma de 170 caballos de rastro, 90 pertenecientes a los llamados Tipo Inspección Federal (TIF) de la Unión Ganadera de Aguascalientes y 80 del rural "5 de junio" del Estado de México. Por digestión artificial no se recuperaron LM de *Trichinella* en ninguna de las muestras. Por otro lado, cuando analizaron los títulos de anticuerpos específicos contra *T. spiralis* por ELISA usando antígenos de E/S, 14/80 (17%) del rastro rural y 6/90 (7%) del TIF dieron positivos. Cuando las muestras de diafragma correspondientes se analizaron por PCR, utilizando 500 ng de ADN de cada muestra y los iniciadores pPra, 2/90 muestras (2%) del TIF y 11/80 muestras (14%) del rural, dieron los productos de amplificación esperados de 600 y/o 800 pb. La sensibilidad del ensayo fue de 7 ng correspondientes a 0.06 LM. Este estudio puso de manifiesto que no existe correlación entre ELISA y PCR, ya que en solo 3/20 muestras que dieron

positivas por ELISA se obtuvieron productos de amplificación de la PCR, sin embargo 11 muestras negativas por ELISA dieron positivas por PCR. Lo anterior sugiere que en estas últimas muestras los niveles de anticuerpos son bajos, por lo que puede tratarse de una infección tardía, cuando el parásito se encuentra en músculo, pudiendo ser detectado por PCR.

Las evidencias hasta ahora obtenidas demuestran que por ELISA es factible detectar anticuerpos contra *Trichinella*, pero que sin embargo, esta detección no guarda relación directa con la presencia del parásito en músculo. Considerando lo anterior, resulta de interés evaluar si entonces existe una correlación entre los niveles de anticuerpos séricos determinados por ELISA y la presencia de LRN de *Trichinella* en sangre determinada por PCR. Si lo anterior resulta cierto, sería una evidencia más que demuestra que el ELISA no es un método de diagnóstico de triquinelosis equina apropiado, debido a que en rastros, lo que se requiere es de un método que permita la detección sensible del parásito en músculo, previniendo de esta forma su transmisión al humano.



6. JUSTIFICACIÓN

En países europeos el consumo de carne de caballo infectado con *Trichinella* ha provocado varios brotes de triquinosis humana a pesar de que se trate de caballos inspeccionados por las autoridades sanitarias de estos países. Esta inspección se realiza empleando el método de digestión artificial, que es el recomendado y elegido por la Comunidad Europea (CE). A pesar de esto, en México, la carne de caballo no ha sido considerada como una fuente importante de infección de *Trichinella* para humanos, a pesar de que su consumo por la población se ha incrementado debido a su bajo costo. En nuestro país, la detección de triquinosis equina se realiza únicamente en rastros TIF, los cuales exportan carne de caballo a países como Francia y Japón, siguiendo las normas impuestas por la CE. En los otros rastros de nuestro país, los llamados tipo rural, se sacrifican caballos cuya carne es destinada a la alimentación de humanos y animales, siendo los requisitos de higiene menos estrictos y hasta donde se ha podido obtener información no se realiza ningún examen para establecer la presencia del parásito. Es importante mencionar que en un estudio realizado por Arriaga y colaboradores (1995)⁶ en un rastro rural del Estado de México, empleando el método de digestión artificial, se detectó en 4 de 80 caballos (5%) la presencia de LM de *T. spiralis*. Debido a la baja sensibilidad del método de digestión artificial, en este estudio fue necesario digerir 40 g de diafragma, lo cual resulta en un proceso costoso y muy laborioso. Estos resultados ponen en evidencia la existencia de triquinosis equina en nuestro país, sin embargo, la presencia real de esta parasitosis no se ha determinado. Por otro lado, estudios realizados en nuestro país, así como en países europeos han demostrado que el diagnóstico serológico de la triquinosis equina no es lo

suficientemente sensible, ya que los niveles de anticuerpos pueden ser bajos y sin embargo las larvas en músculo siguen siendo infectivas. Además, estudios en caballos de rastro empleando ELISA y PCR han puesto de manifiesto que la detección de anticuerpos por ELISA no tienen una correlación directa con la detección del ADN del parásito en muestras de diafragma. Por lo anterior, resulta de interés analizar si la falta de correlación en los estudios anteriores podría deberse al hecho de que en los sueros de caballos en los que es posible la detección de anticuerpos contra *Trichinella*, esté más relacionado con la presencia de la LRN en sangre que con la larva muscular en tejido, y que en caballos con niveles bajos de anticuerpos se relacione con la presencia del parásito en músculo.

Este estudio aportaría evidencias de la importancia de realizar la detección del parásito en músculo por métodos sensibles y eficaces como los del tipo de la PCR, ya que su consumo presenta la vía principal de transmisión de la triquinelosis.

Por otro lado, el diagnóstico de la triquinelosis en sangre realizado por la PCR, permitiría el diagnóstico temprano de la infección, que de poderse llevar a cabo en humanos redituaria en la posibilidad de un tratamiento temprano y efectivo de la infección. Por lo que en este estudio de manera inicial se estandarizó el método de la PCR empleando sangre de ratón colectada a diferentes tiempos después de la infección con *T. spiralis* . Posteriormente se evaluó el uso de este método empleando sangre de caballo.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso potencial del método de la PCR en el diagnóstico de triquinelosis equina empleando sangre de caballos provenientes de dos rastros de la República Mexicana, uno de tipo rural y otro de Tipo Inspección Federal (TIF).

8. OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar el método de PCR utilizando los iniciadores pPRA empleando ADN obtenido de dos fases de desarrollo de *Trichinella spiralis* (LM y LRN), además de emplear sangre de ratón infectado con el parásito, colectada a diferentes tiempos post-infección, y sangre de ratón no infectado salpicado con un número conocido de LRN.

Evaluar el método de PCR en el diagnóstico de triquinelosis equina empleando muestras de sangre de caballos de 2 rastros de la República Mexicana.

Correlacionar las muestras de suero y tejido muscular que resultaron previamente positivas por ELISA y PCR con las muestras positivas por PCR en sangre obtenidas en este estudio.

9. MATERIAL Y MÉTODOS.

OBTENCIÓN DE LARVAS MUSCULARES (LM) DE *T. spiralis* POR DIGESTION ARTIFICIAL Y MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA DEL PARÁSITO.

La obtención de LM se realizó a partir de ratas Sprague Dawley previamente infectadas con *Trichinella spiralis*. Los animales se sacrificaron, se les quitó cabeza, piel, extremidades, vísceras, cuidando de no romper diafragma (sitio de predilección). El músculo esquelético se maceró en una pica-lica Moulinex. El macerado completo se digirió con una solución de Pepsina-Ácido Clorhídrico (HCl) al 1% por 3 h a 37°C, en agitación constante. Posteriormente, la solución se pasó por un tamiz # 40 y se procedió a sedimentar las larvas en tubos Falcon de 15 mL por 20 min. Las larvas se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) pH7.3 (Apéndice) en una centrifuga clínica a 2500 rpm por 3 min. Parte de las LM obtenidas se mantuvieron a -20°C para posteriormente extraer el ADN.

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratas cepa Sprague Dawley de 2 meses de edad, las cuales se infectaron con 3000 LM del parásito viable por vía intragástrica.

OBTENCIÓN DE LARVAS RECIÉN NACIDAS (LRN).

Las ratas de la cepa Sprague Dawley se infectaron por vía oral con 5000 LM de *T. spiralis*, y se sacrificaron a los 6 días de infección. La obtención de la LRN se realizó siguiendo la técnica de Dennis y colaboradores (1970)¹⁴. El intestino delgado se extrajo y se cortó longitudinalmente y en segmentos aproximados de 2 cm. Estos segmentos se depositaron en un aparato de Baerman provisto de una capa doble de gasa y amortiguador de fosfatos (PBS) pH7.3. Posteriormente, el aparato de Baerman se incubó a 37°C por

3h. Los parásitos adultos obtenidos se lavaron dos veces con PBS 1X y una tercera vez con medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera al 10% previamente descomplementado. El sobrenadante se desechó y los organismos adultos se incubaron en medio RPMI 1640 estéril adicionado de una mezcla de penicilina-estreptomicina 10,000 U/ μ g/ml y suero fetal de ternera al 10%v/v descomplementado (Hyclone Laboratories. USA) en atmósfera de 5% de CO₂ y a 37°C durante 24h. Las LRN puestas por las hembras durante el periodo de incubación, fueron separadas de los adultos y concentradas por centrifugación diferencial a baja velocidad 1500 rpm. Las LRN se mantuvieron a -20°C para posteriormente realizar la extracción del ADN.

INFECCIÓN EXPERIMENTAL EN RATONES DE LA CEPA BALB/c.

Ratones machos de la cepa BALB/c fueron infectados via oral con 500 larvas de *T. spiralis* resuspendidas en Bactoagar al 0.2% (Apéndice), con una cánula intragástrica. Grupos de 3 animales infectados se sangraron a los 3, 5, 7, 11, 12, 14, 17 y 19 días post- infección (p.i.). Se incluyó un grupo control sin infectar.

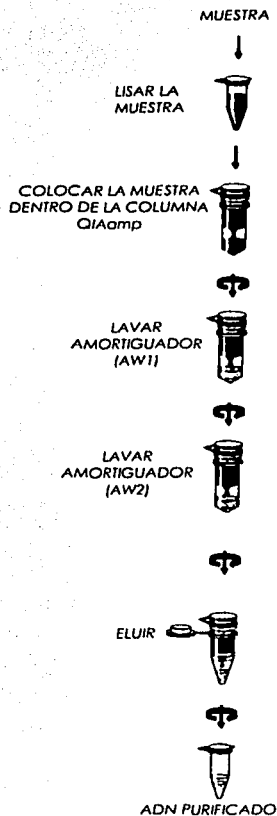
La sangre de los ratones infectados con *T. spiralis* y no infectados se colectó en tubos eppendorf y de forma inmediata se llevó a cabo la extracción de ADN, el cual se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización en PCR.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE CABALLO DE RASTRO.

Se obtuvieron 20 muestras de sangre de caballo de las cuales 7 pertenecen a un rastro TIF (Aguascalientes) y 13 de un rastro rural (5 de Julio de San Vicente Chicoloapan, Edo. de México). Estas muestras fueron almacenadas a -20°C y posteriormente fueron procesadas para la

obtención directa de ADN y desarrollo de PCR con la finalidad de determinar la presencia de *T. spiralis*. Muestras de suero y tejido muscular de diafragma de estos mismos caballos de rastro, fueron analizadas anteriormente por ELISA y PCR respectivamente.

EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE EL QIAamp DNA Mini Kit.



La extracción de ADN de muestras de sangre de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis*, así como de LRN y LM de *T. spiralis* previamente aisladas, se realizó siguiendo el protocolo estándar incluido dentro del QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania). Para la extracción del ADN de sangre de caballo de rastro, las muestras se procesaron de la misma manera. El volumen de muestra utilizada fue de 250 μL , a la cual se le agregó 25 μL de proteinasa K más 250 μL de amortiguador AL (proporcionado por el proveedor), dicha mezcla se agitó en vortex por 15 s para tener una solución homogénea. Posteriormente, se incubó a 56°C durante 10 min. y se centrifugó brevemente. A estas solución se le adicionó 250 μL de etanol (96-100%) y se mezcló en vortex por 15 s y se centrifugó brevemente. La mezcla anterior se colocó dentro de la columna QIAamp spin y se centrifugó a 8000 rpm 1min descartando el tubo con el filtrado. Posteriormente, se colocó un tubo nuevo y se adicionó a la columna 500 μL de amortiguador W1 centrifugando a 8000 rpm 1 min, descartándose

nuevamente el filtrado. Se adicionó a la columna 500 μ L de amortiguador AW2 colectándose en un nuevo tubo recolector y se centrifugó a 14000 rpm 3 min. El filtrado se descartó. Finalmente se adicionó 50 μ L de amortiguador AE a la columna, dejando incubando a temperatura ambiente por 5 min para obtener un mayor rendimiento, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm 1min y se obtuvo el ADN.

El ADN obtenido de las diferentes muestras procesadas se cuantificó, usando el método de PicoGreen® (Molecular Probes, Oregon USA). Las muestras se guardaron a -20°C hasta la realización de la PCR. Para verificar la pureza e integridad del ADN se usó una alícuota de 4 μ L de ADN de cada una de las muestras y se analizó en un gel de agarosa al 1 % en amortiguador TBE 1X (Apéndice). Previamente la alícuota se mezcló con amortiguador de muestra (Apéndice) y se cargó esta mezcla en el gel y se corrió a 100 Volts por 35 min. Los geles se tiñeron con SYBR™ Green 1:10000 (Molecular Probes, Oregon USA) y se observaron a través del transiluminador (SynGene GeneSnap, Versión 4).

EXTRACCIÓN DE ADN CON FENOL-CLOROFORMO-ALCOHOL ISOAMILICO

La extracción de ADN de LRN y LM de *T. spiralis*, así como de sangre de caballos de rastro, también se realizó siguiendo el método descrito previamente por Soulé y colaboradores (1993)⁴⁶. A 5mL de cada muestra de sangre se les agregó el amortiguador de lisis (10mM de Tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA pH 8, 100mM de NaCl y 0.5% SDS) y 300 μ g/mL de proteínasa K y se incubaron a 55°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1) y se centrifugó a 3000 rpm a 4°C por 10 min (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge). A la fase acuosa se le añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 20 μ L de glucógeno

(1mg/mL) y se mantuvo a -70°C por 1 h. Posteriormente, se centrifugó a 4°C , 15 min a 14000 rpm. El ADN se disolvió en 3000 μL de TE (Tris-HCl, EDTA) libre de DNAsa y se añadió 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNAsa incubándose por 1 h a 37°C . Se prosiguió a realizar una extracción con un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), a la fase acuosa se le adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto incubándose 1 h a -70°C y se centrifugó. El paquete obtenido se lavó dos veces con 500 μL de etanol 70%, se dejó secar y el ADN se resuspendió en 100 μL de TE.

La cuantificación del ADN obtenido de las diferentes muestras, así como la integridad y pureza se realizó como se describió anteriormente.

AMPLIFICACIÓN DEL ADN DE *T. spiralis* MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EMPLEANDO LOS INICIADORES pPRA.

Para la estandarización de la técnica de la PCR se utilizó el ADN obtenido de LRN y LM de *T. spiralis*, así como de sangre de ratón infectado y sin infectar. En el PCR se emplearon los iniciadores pPRA que amplifican fragmentos específicos de 600 y 800 pb, que forman parte de una secuencia repetida de 1.6 Kb de *T. spiralis* descrita por Dick y colaboradores (1992)¹⁷. La secuencia de los iniciadores pPRA es: 203- 5' GTAAAGCGGTGGTGCGTATTCAT 3' y pPRA 804- 5' AGTTGCATACCGAACAACCGCTC 3'. Las condiciones para la PCR fueron las mismas en todos los casos, variando la concentración de ADN de cada tipo de muestra.

Para determinar la sensibilidad del método de la PCR, se empleó el ADN de LRN aisladas a diferentes concentraciones (0.94-188ng), observándose los productos de amplificación. En el caso de LM se usó de 250ng hasta 500ng de ADN. Además, se realizó la PCR con una muestra de ADN obtenida de sangre de ratón no infectada a la cual se le añadieron 2000



LRN de *T. spiralis*, a partir de la cual se tomaron alícuotas correspondientes a diferentes concentraciones de ADN. Una vez estandarizado el método de la PCR y determinada la sensibilidad del ensayo, se procedió a amplificar 500ng de ADN de LRN de sangre de ratón infectado y sin infectar. En el caso del ADN de muestras de sangre de caballo de rastro, se realizó la PCR con 500ng de ADN obtenido con el kit QIAamp y de 1000 a 1500ng para ADN obtenido según el protocolo recomendado por Soulé y colaboradores (1993)⁴⁶. La reacción de la PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ L y en algunos casos para muestras de ADN de sangre de caballo en un volumen de 100 μ L, la mezcla de reacción contenía: 5 μ L de amortiguador de reacción de PCR 10X (Tris-HCl 10 mM, cloruro de magnesio 1.5 mM, cloruro de potasio 5 mM, 0.1% de Tritón X100, gelatina 0.1%), 1 μ L de cada desoxinucleósido trifosfatado 10mM, 5 μ L de MgCl_2 2.5 mM, con 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada oligonucleótido sistelizados por Operon Technologies, Inc. y 1.25 U// μL de TaqADN polimerasa (Perkin Elmer Corp. San José Ca. EUA), volumen de muestra de ADN correspondiente a la concentración de cada una de las muestras, ya mencionado anteriormente. La mezcla de reacción se precalentó a 95°C por 5 min. Todas las muestras fueron sometidas a 30 ciclos de amplificación usando un termociclador automático Perkin Elmer 9600 (Perkin Elmer Corp. San José Ca. EUA). Cada ciclo consistió de un paso de desnaturalización de 1 min a 94°C, un paso de alineamiento de 1 min de 55°C y un paso de extensión de 2 min a 72°C. Después de cubrir los 30 ciclos, un paso final de extensión durante 7 min a 72°C.

Para analizar los productos de amplificación, éstos se mezclaron con amortiguador de muestra 6X (Apendice) y se separaron en geles de agarosa al 2% en TBE 1X (Apéndice). Los geles se corrieron a 120 Volts por 1

h. Los pesos moleculares utilizados fueron DNA molecular weight marker XIV (Boehringer Mannheim GMBH. Alemania) con un rango de 100 a 1500pb y una banda adicional de 2642pb. Los geles se tiñeron con SYBRTM Green 1:10000 y se observaron a través del transiluminador SynGene.



10. RESULTADOS

El ADN extraído de LRN y LM de *T. spiralis*, así como de la sangre de ratones sin infectar e infectados con el parásito, obtenida a diferentes tiempos después de la infección empleando el Kit QIAamp, tuvo un alto grado de pureza e integridad (Figura 9).

Días p.i. → 3 5 7 11 12 14 17 19 RSI LRN LM

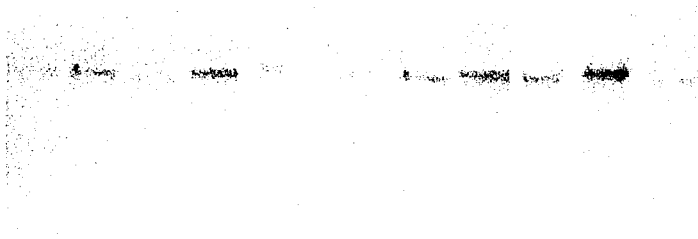


Figura 9. Análisis de pureza e integridad del ADN obtenido de sangre de ratón infectado con 500 LM de *T. spiralis*, colectada a diferentes días después de la infección (3-19), ADN de sangre de ratón sin infectar (RSI), ADN de LRN y LM empleando el kit QIAamp.

La sensibilidad de la PCR, empleando diferentes cantidades de ADN de LRN obtenido mediante QIAamp fue de 2.9ng, equivalente a 3 LRN de *T. spiralis* (figura 10, carril 8). Los productos de amplificación obtenidos fueron de 600 y 800 pb y uno inespecífico de 230 pb.

Por otro lado, la sensibilidad del PCR usando ADN extraído de sangre de ratón no infectado al cual se le adicionaron 2000 LRN de *T. spiralis* fue de 10.71ng correspondiente al ADN de 3 LRN (Figura 11, carril 9). No se observaron productos de amplificación cuando se usaron 500ng de ADN de sangre de ratón no infectado (Figura 11, carril 12). Los controles positivos usados fueron 250ng de ADN de LM y 500ng de ADN de LRN aislada, en donde se observan los fragmentos amplificados específicos de 800 y 600 pb (Figura 11, carril 1 y 2 respectivamente).

Al evaluar el uso de la PCR para la detección temprana de *T. spiralis* en sangre de ratones infectados experimentalmente, colectada a diferentes días post-infección (p.i.), empleando ADN extraído con el Kit QIAamp, se observaron los productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb, así como el inespecífico de 230pb a partir del día 5 hasta el 14 p.i. En el día 17 p.i. no se observó amplificación del ADN, sin embargo para el día 19 se observaron nuevamente los fragmentos de 800 y 600 pb. Posterior a este día ya no se volvió a detectar la amplificación de dichos fragmentos (Figura 12).

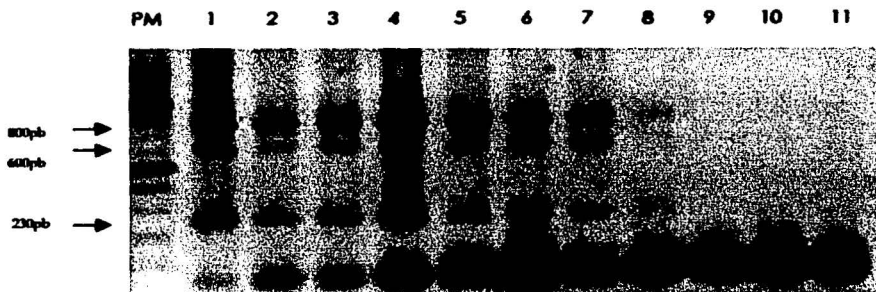


Figura 10. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando diferentes concentraciones de ADN obtenido de LRN de *T. spiralis*. Carril 1: control positivo (250ng de ADN de LM); carril 2 : 188ng; carril 3: 94ng; carril 4: 47ng; carril 5: 23.5ng; carril 6: 11.75ng; carril 7: 5.86ng; carril 8: 2.9ng; carril 9: 1.47 ng; carril 10: 0.94ng; carril 11: control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR, fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñidas con SBR Green 1:10000.

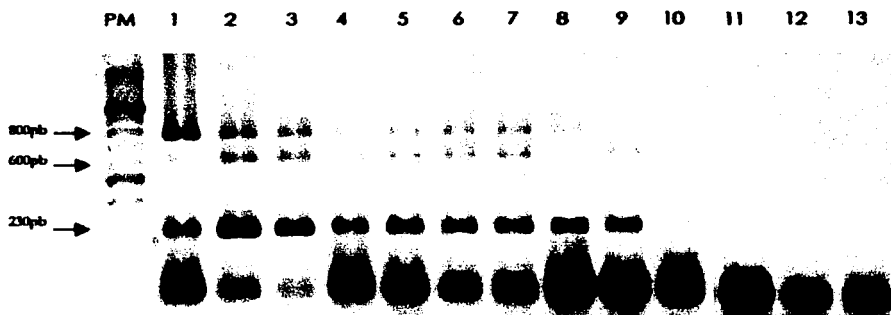


Figura 11. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando diferentes concentraciones de ADN obtenido de sangre de ratón salpicada con 2000 LRN de *Trichinella spiralis*. Carril 1: Control positivo (250ng de ADN de LM); carril 2: Control positivo (500ng de ADN de LRN aisladas); carril 3: 714.25ng; carril 4: 357.12ng; carril 5: 178.56ng; carril 6: 89.28ng; carril 7: 44.64ng; carril 8: 21.43ng; carril 9: 10.71ng que corresponden a 3 LRN; carril 10: 7.14ng; carril 11: 3.57ng; carril 12: 500ng de sangre de ratón sin infectar; carril 13: Control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñidas con SBR Green 1:10000.

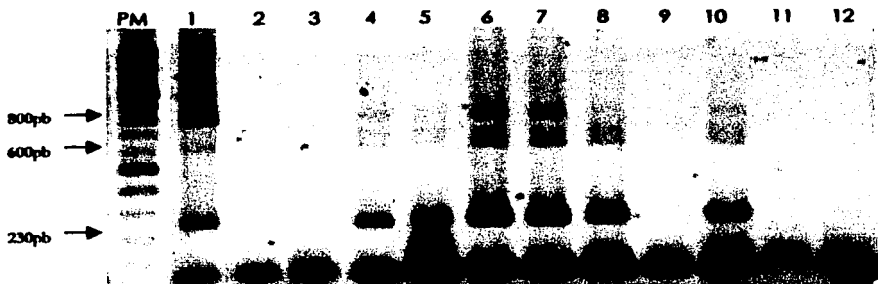


Figura 12. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) obtenidos con 500ng de ADN de sangre de ratones infectados con *Trichinella spiralis* colectada a diferentes días después de la infección (p.i.). Carril 1: control positivo (250 ng de ADN de LM); carril 2: día 0; carril 3: día 3 p.i.; carril 4: día 5 p.i.; carril 5: día 7 p.i.; carril 6: día 11 p.i.; carril 7: día 12 p.i.; carril 8: día 14 p.i.; carril 9: día 17 p.i.; carril 10: día 19 p.i.; carril 11: día 21 p.i.; carril 12: Control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñidas con SBR Green 1:10000.

Una vez estandarizado el método y determinado la sensibilidad de este, se procedió a realizar la extracción de ADN de muestras de sangre de caballo obtenidas de los 2 rastros. En la extracción del ADN se usó inicialmente el Kit QIAamp y se emplearon 500 ng de ADN obtenido de cada una de las muestras de sangre de caballo para realizar el PCR, cantidad a la que en el ensayo de sensibilidad con sangre de ratón a la que se le adicionaron 2000 LRN, se detectaron los productos de amplificación esperados (Figura 11). Para cada una de las muestras de ADN de sangre se incluyó un control positivo, que consistió en salpicar a 250 ng de ADN de las muestras con 250ng de ADN de LRN purificada. En este ensayo en los controles positivos (Figura 13, carriles 3, 5, 7, 9 y 11) se observó la presencia de los fragmentos específicos 600 y/o 800 pb y el inespecífico de 230pb. Sin embargo en las muestras problema de ADN de sangre de caballo no hubo evidencia de que alguna muestra de sangre fuera positiva. En la muestra S-17, se observó la presencia de una banda nítida de aproximadamente 400pb (Figura 13, carril 8). El ensayo se repitió 2 veces.

Con la finalidad de determinar con mayor certeza si las muestras de sangre de caballo eran negativas para la presencia de LRN de *T. spiralis*, se consideró realizar la extracción de ADN mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico descrita por Soulé y colaboradores (1993)⁴⁶ usando un volumen mayor de sangre. De esta forma se extrajo el ADN de 5 mL de sangre de caballo de rastro, el cual se amplificó por la PCR empleando los iniciadores pPRA (Figura 14 y 15). En este ensayo se detectaron 5/20 muestras positivas, presentando 1 ó los 2 productos de amplificación específicos. Así, en las muestras S-16, S-18 y S-19 se observó la banda específica de 600pb (Figuras 14, carril 10 y Figura 15, carriles 4 y 6) y

en las muestras S-7 y S-17 se observaron las bandas específicas de 600 y 800 pb (Figuras 14, carril 8 y Figura 15, carril 2). Se usaron como controles positivos, 250 ng de ADN de LM y 500 ng de ADN de LRN de *T. Spiralis* (Figura 14, carril 1 y 2), así mismo 1000ng de ADN de sangre de caballo de rastro que fue negativo por ELISA y PCR, salpicado con 500 ng de ADN de LRN purificada (Figura 14, carril 3). En el caso de los controles de LM y LRN purificadas se observaron los productos de amplificación esperados, sin embargo en el control positivo de ADN de sangre de caballo salpicada con ADN de LRN, se observaron además de los fragmentos esperados, específicos y el inespecífico, se observó un fragmento inesperado de aproximadamente 400pb, fragmento que también fue observado al realizarse amplificación de ADN de sangre de algunos caballos de rastro (Figura 14 y 15).

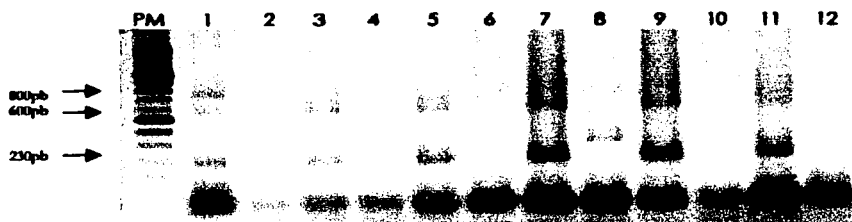


Figura 13. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando 500ng de ADN de algunas muestras de sangre obtenidas de caballos de rastró empleando el kit QIAamp sin salpicar ó salpicando con ADN de LRN purificada. Carril 1: control positivo (250ng de ADN de LM); carril 2: S-4; carril 3: S-4 + LRN; carril 4: S-9; carril 5: S-9 + LRN; carril 6: S-12; carril 7: S-12 + LRN; carril 8: S-17; carril 9: S-17 + LRN; carril 10: S-19; carril 11: S-19 + LRN; carril 12: Control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron analizadas en un gel de agarosa al 2% y teñidas con SBR Green 1:10000.

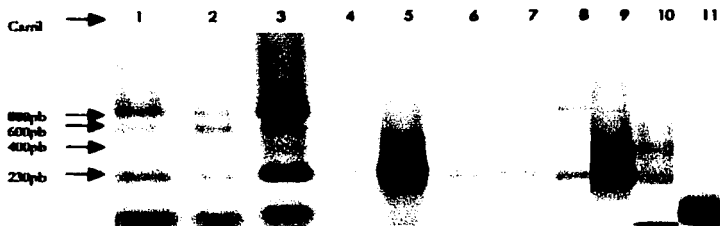


Figura 14. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) obtenidos con ADN de algunas muestras de sangre de caballo de rastro extraído de acuerdo a lo recomendado por Souté y cols. (1993). Carril 1: control positivo (250ng de ADN de LM); carril 2: control positivo (500ng de ADN de LRN); carril 3: control positivo (1000ng de ADN de sangre de caballo de rastro negativa por PCR salpicada con 500ng de ADN de LRN); carril 4: 1500 ng de ADN de S-1; carril 5: 1500ng de ADN de S-2; carril 6: 1000ng de ADN de S-4; carril 7: 1000ng de ADN de S-6; carril 8: 1000ng de ADN de S-7 ; carril 9: 1000ng de ADN de S-9; carril 10: 1500 ng de ADN de S-16; carril 11: control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% y teñidos con SBR Green 1:10000.

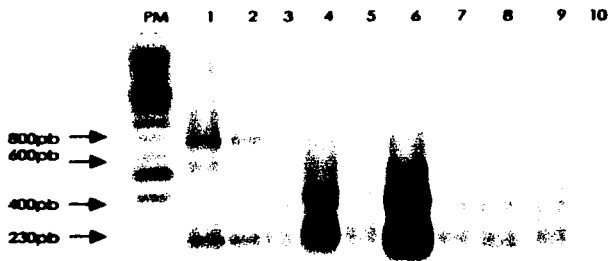


Figura 15. Análisis de productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) obtenidos con ADN de algunas muestras de sangre de caballo de rastro extraído de acuerdo a lo recomendado por Soulé y cols. (1993). Carril 1: control positivo (500ng de ADN de LRN); carril 2: 1500ng de ADN de S-17; carril 3: 1500ng de ADN de S-10; carril 4: 1000 ng de ADN de S-18; carril 5: 1500ng de S-11; carril 6: 1000ng de ADN de S-19; carril 7: 1500ng de ADN de S-12; carril 8: 1500ng de ADN de S-13 ; carril 9: 1500ng de ADN de S-20; carril 10: control de reactivos. Los productos de amplificación obtenidos por PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% y teñidos con SBR Green 1:10000.

Los resultados obtenidos en este estudio, se compararon con los resultados obtenidos por Viveros y colaboradores (2001)⁵⁵, empleando muestras de suero y tejido muscular (diafragma y lengua) correspondientes a los mismos caballos, y analizados por ELISA, PCR y digestión artificial (Tabla 4).

Como puede observarse, al emplear el método de digestión artificial, no se detectaron muestras positivas en ninguno de los 2 rastros, sin embargo por PCR de diafragma y lengua se observaron en el rastro TIF 2 y 3 muestras positivas respectivamente. Sin embargo por ELISA, 5/7 muestras de suero dieron valores positivos, de estas 5 muestras positivas por ELISA, solo 2 resultaron positivas por PCR de lengua y 1 por diafragma. De las muestras positivas por ELISA (5) solo 1 de ellas resultó positiva cuando se realizó el PCR de sangre, resultando negativo por PCR de tejido muscular.

Con respecto al rastro rural, 8/13 muestras de tejido muscular (diafragma y lengua) dieron productos de amplificación específicos por PCR y por ELISA 7/13 dieron valores positivos. De estas muestras positivas solo 2 fueron positivas por ambos métodos y de éstas una fue positiva también por PCR de sangre. Sin embargo 3 muestras más positivas por ELISA dieron productos de amplificación específicos por PCR de sangre, es decir de 7 muestras positivas por ELISA, 4 de ellas también son positivas por PCR de sangre.

De las 20 muestras en total analizadas por los diferentes métodos, 12 muestras son positivas por ELISA y 8 dieron valores negativos en ELISA (40%), sin embargo estos 8 caballos resultan positivos por PCR de músculo. Por otro lado, de las 12 muestras ELISA positivas, 4 de éstas fueron positivas por PCR de músculo de lengua y/o diafragma (33%) y 5/12 (42%) dieron

productos de amplificación específicos cuando se realizó PCR de muestras de sangre. En general, las muestras positivas por PCR de sangre, también fueron ELISA positivas.

Tabla 4. Resultados del análisis de muestras de suero, diafragma, lengua y sangre de caballo de rastro TIF y del Rastro Rural realizadas por ELISA, Digestión artificial (DA) y PCR.

Rastro	TIF (Unión Ganadera de Aguascalientes)										Rural ("5 de Junio" del Estado de México)										
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	S-11	S-12	S-13	S-14	S-15	S-16	S-17	S-18	S-19	S-20	
No. de Caballo	21	64	67	68	69	81	86	102	123	125	127	136	138	148	150	152	155	166	168	170	
Digestión Artificial
PCR lengua	.	+	.	+	+	+	.	+
PCR Diafragma	.	.	+	+	+	.	+	+	.	+	+	.	.	.	+	+	.
PCR Sangre	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ELISA	+	+	.	+	.	+	+	+	+	.	.	.	+	.	.	+	+	+	+	+	.

11. DISCUSIÓN

No hay evidencias científicas y epidemiológicas del modo natural de transmisión de *Trichinella* en caballos, sin embargo, dos hipótesis se han propuesto como modo de transmisión: 1) por ingestión de alimentos contaminados con cadáveres de roedores infectados y/o pedazos de carne de cerdo infectada y 2) por ingestión de carne de animales criados en cautiverio infectados con el parásito, ésta hipótesis es apoyada, ya que en muchos países, es común el uso de proteínas de animales en la alimentación de animales herbívoros, por lo que se emplea una mezcla de carne de animales para engordar a los caballos antes de su sacrificio ³⁶.

Independientemente del método en que los caballos se infectaron con *Trichinella*, varios brotes de triquinelosis humana han sido causados por el consumo de carne de caballo en países europeos (Francia e Italia), donde cerca del 30% de la población tiene el hábito culinario de consumir carne de caballo cruda o semicocida como tártara o carpaccio ³⁷. En México existen rastros tipo inspección federal (TIF) a partir de los cuales se exportan canales de caballo a Francia y Japón, sin embargo no existe mucha información sobre la presencia de triquinelosis equina, aunque se han detectado caballos infectados naturalmente con *Trichinella spiralis* ⁶, que son sacrificados en un rastro del Estado de México. Además, en México cada vez es mayor el consumo de carne de caballo que proviene de rastros rurales debido a su bajo costo. A este respecto, existen regulaciones de la Comisión Europea que exigen que la carne de caballo de rastros, no sólo en los países donde se han presentado brotes, sino también en países exportadores de carne de caballo como los países de Europa del Este y México, estén bajo inspección sanitaria. Sin embargo, en los rastros donde

se lleva a cabo la inspección de los caballos, ésta se realiza por digestión artificial del diafragma de los caballos y no ha resultado lo suficientemente adecuada debido a la baja sensibilidad del método, por lo que se han seguido presentando brotes de triquinosis. Dentro de las causas que afecta la sensibilidad del método de digestión artificial puede ser principalmente la carga parasitaria, la cual en caballos se ha evidenciado que es baja, además de que la cantidad de muestras a analizar influye en la capacidad de detección del parásito ^{23, 32}.

Una alternativa al diagnóstico de triquinosis equina es el diagnóstico serológico, sin embargo, la aplicación de ensayos de tipo ELISA e IET no han sido lo suficientemente sensibles para identificar a todos los caballos infectados con *Trichinella*, ya que los niveles de anticuerpos contra el parásito pueden ser bajos, aunque las larvas en los músculos de los caballos todavía sean infectivas ^{5, 37, 57}.

Por otro lado, existen evidencias de que la amplificación del ADN del parásito por PCR, constituye una alternativa para el diagnóstico sensible y específico de triquinosis, además de permitir el diagnóstico temprano de la infección ^{6, 47}.

En este estudio se aplicó inicialmente la técnica de la PCR con la finalidad de evaluar su uso en el diagnóstico de triquinosis equina durante la fase temprana de la infección, representado por la presencia de LRN en sangre. Para lograr esto, se empleó inicialmente un modelo murino, colectándose la sangre a diferentes días p.i. y habiéndose estandarizado previamente la PCR con el empleo de ADN purificado de LRN de *T. spiralis*. En estos ensayos se utilizaron los iniciadores pPRA, que

tienen homología en la secuencia repetida de 1.6 Kb de *T. spiralis*, obteniéndose la amplificación de dos productos específicos de 600 y 800 pb.

La sensibilidad de la PCR bajo las condiciones estandarizadas fue de 2.94 ng equivalente a 3 LRN. Estudios de la PCR previos con ADN de LM han reportado una sensibilidad desde 0.02 de larva a 2 LM²⁰, de tal forma que la sensibilidad determinada en este estudio es buena, considerando que la LRN es aproximadamente 60 veces más pequeña que la LM del parásito. Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó sangre de ratón sin infectar a la cual se añadió un número conocido de LRN.

Cuando se evaluó el uso de la PCR usando los iniciadores pPra, para el diagnóstico temprano de *T. spiralis* en sangre de ratones infectados experimentalmente con 500 LM, fué posible detectar la presencia de la LRN a partir del día 5 hasta el día 14 p.i., desapareciendo en sangre al día 17 p.i. para detectarse nuevamente el día 19 p.i. Esto último pudiera deberse posiblemente a la disminución del número de LRN en sangre originada por el proceso de expulsión del organismo adulto del intestino de animales infectados y con la ausencia ó disminución de la fecundidad de la hembra adulta. Resultados similares fueron observados por Soulé y colaboradores (1994)⁴⁷ analizando por la PCR la sangre de un caballo infectado experimentalmente.

Una vez que se demostró en el modelo murino, el uso de la PCR en el diagnóstico temprano de la triquinosis, se procedió a analizar por la PCR muestras de sangre de caballo colectados de 2 rastros de la República Mexicana, uno de tipo TIF y el otro rural.

Se usaron dos técnicas para la extracción del ADN, en uno de los cuales se empleó el Kit QIAamp y en la otra el ADN se purificó empleando extracciones con fenol-cloroformo. Con el ADN obtenido mediante el kit no fue posible observar los productos de amplificación esperados. Sin embargo los controles positivos, los cuales fueron ADN de sangre de cada uno de los caballos salpicada con 250ng de ADN de LRN purificada mostraron amplificación, por lo que en la reacción de la PCR no había presencia de factores de inhibición de la amplificación. La ausencia de amplificación pudo ser causa por la cantidad de sangre analizada (200 μ L) que posiblemente reduce la posibilidad de detectar la presencia de LRN cuando la carga parasitaria es baja.

Para confirmar los resultados anteriores se procedió a realizar una segunda técnica de extracción de ADN siguiendo la metodología descrita por Soulé y colaboradores (1993)⁴⁶ a partir de un volumen mayor de muestra de sangre (5 mL). Con el ADN así obtenido se detectó como positivos a algunos de los caballos, obteniéndose que 5/20 (25%) muestras de ADN de sangre de ambos rastros fueron positivas, amplificando los fragmentos específicos de 600 y/o 800 pb y el inespecífico de 230pb. Es importante mencionar que en algunas muestras de sangre se amplificó un fragmento más de aproximadamente 400pb, observándose también cuando el ADN de muestras de caballo se salpicaron con ADN de LRN. A este respecto, es probable que los caballos del país se encuentre infectados con una variante de *Trichinella spiralis* y que en la secuencia de 1.6 kb se encuentre uno o varios cambios que con los iniciadores pPRA den como resultado otro producto de amplificación. Sin embargo para determinar su especificidad sería conveniente llevar a cabo ensayos de hibridación.

Los resultados de la PCR muestran la posibilidad de detectar la presencia de LRN de *T. spiralis* en sangre de caballos de rastro.

Debido a que las muestras de sangre de caballo analizadas por la PCR en este estudio y las muestras de suero, diafragma y lengua previamente estudiadas por ELISA y PCR, fueron estudiadas de los mismos caballos, fue posible entonces hacer un análisis de los porcentajes de positividad obtenidas con cada uno de los métodos de diagnóstico empleados y determinar si la presencia de la LRN en sangre está directamente relacionado con muestras positivas por ELISA.

Del análisis realizado resultó evidente la baja sensibilidad del método de digestión artificial. Por otro lado resalta el que las muestras negativas por ELISA, todas fueron positivas para la presencia del parásito, cuando sus músculos se estudiaron por la PCR. Estos resultados indican que el ELISA no es el mejor método de diagnóstico de triquinosis equina cuando se trata de una infección tardía, es decir, cuando las larvas se encuentran ya en músculo.

También se puede resaltar que en el 42% de las muestras positivas por ELISA fue posible detectar por la PCR la presencia de la LRN en sangre. Estas evidencias sugieren que estos caballos (S-7, S-16, S-17, S-18 y S-19) tenían una infección temprana, sin embargo en la muestra S-19 fue posible también detectar al parásito en diafragma posiblemente explicándose por el posible inicio de la migración de la LRN a músculo.

Además en sólo 4 de las muestras positivas por ELISA (33%), se detectó por la PCR la LM en músculo, pero fueron negativas por la PCR en sangre. Este

hecho podría sugerir que el parásito se encontraba ya en músculo, pero que todavía persistían anticuerpos contra el parásito en suero o bien que la carga parasitaria de LRN en sangre estaba por debajo de la sensibilidad del método de la PCR, por lo que no fue posible detectarla. Sin embargo de una u otra forma se trataría de una infección más avanzada cuando la LRN ha invadido el músculo.

De todo lo anterior podemos concluir que existe una relativa correlación entre la detección en suero de anticuerpos contra el parásito y la presencia de la LRN en sangre. Por otro lado y más importante en el diagnóstico de triquinosis equina es el hecho de que el ELISA no resulta un método apropiado de detección cuando la infección se encuentra en fase tardía, es decir en músculo. Esto último, es muy relevante ya que finalmente la triquinosis se transmite cuando el humano consume carne de caballo infectada con *Trichinella*. Así mismo, se pone en evidencia que a pesar de que un caballo resulte ELISA positivo, esto no asegura que los músculos del animal se encuentren invadidos por las LRN y su carne pudiera consumirse. Además este análisis ayuda a entender por que a pesar de que los canales de caballo se inspeccionen por digestión artificial, a menos que la carga parasitaria sea altísima, no es posible detectar la presencia del parásito, por lo que han seguido ocurriendo los brotes de triquinosis humana principalmente en países europeos.

En este estudio también se pone de manifiesto que la PCR de sangre puede ser un método de diagnóstico sensible y específico para determinar infecciones tempranas que pueda aplicarse en el diagnóstico de triquinosis humana, ya que los ensayos serológicos realizados para este fin no permiten esta detección.

12. CONCLUSIONES

- 1) El PCR permite detectar la presencia de las LRN en sangre de ratón durante la fase temprana de la infección a partir del día 5 p.i. Además, en sangre de caballos de rastro fue posible demostrar la presencia del parásito.
- 2) Será importante realizar estudios con humanos para evaluar el uso del PCR de sangre, en el diagnóstico temprano de la triquinosis.
- 3) Existe una correlación relativa entre los niveles de anticuerpos séricos contra *Trichinella* y la presencia de la LRN del parásito en sangre.
- 4) El ensayo de PCR en tejido muscular de caballos de rastro es una mejor alternativa para el diagnóstico de triquinosis equina que los ensayos serológicos del tipo ELISA ó de PCR en sangre. Considerando que el consumo de la carne es la vía principal de transmisión de esta parasitosis.

13. APÉNDICE

- Agar 0.2% p/v.

0.2g de Bactoagar en 100 mL de agua.

AMORTIGUADORES

- Amortiguador de fosfatos salinos (PBS) 10X

87.66g NaCl 150mM, 42.89g Na₂HPO₄ 16mM, 5.519g NaH₂PO₄ · H₂O 4mM, 2.0g KCl, ajustar el pH a 7.3 y aforar a 1 L. Filtrar y esterilizar.

- Amortiguador de tris boratos (TBE) 10X

Tris 1.0M, Acido bórico 0.9M y EDTA 0.01M

- Amortiguador de lisis.

Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, NaCl 100mM, SDS 0.5% y 300 de proteinasa K.

- Amortiguador de muestra 6X

0.025g de azul de bromofenol, 0.025g de xilencianol, 3 mL de glicerol, aforar a 10mL con agua.



14. BIBLIOGRAFÍA

1. Ancelle, T., 1998a. History of trichinellosis linked to horsemeat consumption, 1975-1998. *Eurosurveillance* 8(9): 86-89.
2. Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Bougnoux, M.E., Fourestie, V., Petit, H., Mougeot, G., Nozais, J.P., Lapierre, J., 1988. Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *American Journal of Epidemiology*, 127: 1302-1311.
3. Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Desenclos, J.C., Maillot, E., Savage-Houze, S., Charlet, F., Drucker, J., Moren, A., 1998b. A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France in 1993. *American Journal of Tropical Medicine Hygienic*, 59: 615-619.
4. 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.
5. 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, G., Gamble, H.R., Knapen F. van and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp.143-147.
6. Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., Viveros, N., Adame, L.A., Zarlenga, D.S., Lichtenfels, J.R. Benitez, E., Ortega-Pierres, M.G., 1995. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *Journal of Parasitology*. 81(5): 781-783
7. Arriaga-Díaz, D; L. Yépez-Mulia & M.G. Ortega-Pierres. 1996 . Actualidades sobre la triquinelosis equina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 38: 139-150.
8. 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 Brushi F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press Rome, Italy. pp 593-598.

9. Boireau P., Vallée I., Roman T., Pret C., Mingyuan Liu., Gamble H. R., Gajadhar A. 2000. *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Veterinary Parasitology* 93: 309-320.
10. Capó, V. and Despommier, D. 1996. Clinical aspects of Infection with *Trichinella* ssp. *Clinical Microbiology Reviews* 9 (1): 47-54.
11. Chapa-Ruiz M. R., González-Pantaleón D., Morales-Galán A., Contreras-Ramos A., Salinas-Tobón M. R. And Martínez y Zamora R. 2001. A follow-up study of the human class and subclass antibody response develop against the adult stage of *Trichinella spiralis*. *Parasite*, 8: S163-S167.
12. Correa D., De la Rosa J. L. and Ortega-Pierres M. G. 1997. Trichinellosis: human epidemiological data in México form 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.
13. Craig y Faust. 1974. *Parasitología Clínica*. 1a edición. Salvat Editores de México, S.A. -París 7- México D.F. pp.263-272.
14. 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.
15. Despommier D. D. 1983. Biology. In: *Trichinella* and trichinosis W. C. Campel. Ed. New York: Plenum press. Pp75.
16. Despommier, D.D. How Does *Trichinella spiralis* make itself at home?. 1998. *Parasitology Today*, vol, 14. No.8: 318-322.
17. Dick T.A., Lu MC, de Vos T, Ma K. 1992. The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*. 78: 145-148.
18. Dupouy-Camel 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, G., Gamble, H.R., Knapen F. van and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp. 545-550.

19. Dupouy-Camet J., Soulé, C., Ancelle T. 1994. Recent news on Trichinellosis: another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. Parasite. 1: 99-103
20. Dupouy-Camet J., Soulé C., Guillou JP., Rouer E., Lavareda de Souza S, Ancelle C., Benarous R. 1991. Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. Parasitology Research. 77: 180-182.
21. Forbes LB, Gajadhar AA. 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. Nov; 62 (11): 1308-13.
22. Gajadhar A. A., Gamble H. R. 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. Veterinary Parasitology 93: 183-189.
23. Gamble, H.R., Gajadhar, A.A., Solomon, M.B. 1996. Sensitivity of direct and indirect methods for the detection of trichinellosis in pigs and horses., p.447-452 in: Ortega-Pierres, G., Gamble, H.R., Knapen F. van and Wakelin D. (ed) Trichinellosis. Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. México. pp.447-452
24. Hermanowska-Spakowicz, T., Lukjan, W., Panewicz, S., Daniluk, J., Siwak, E., and Kondrusik, M. 1993. Epidemiological and clinical analysis of the incidence of trichinellosis in North Eastern region of Poland, p. 469-474. In W.S. Campbell, E. Pozio, and F. Bruschi (ed.), Trichinellosis. Proceedings of the 8th International Conference on Trichinosis, 1993. Instituto Superiore di Santá Press, Rome.
25. Maillot E. 1998. Triquinosis relacionada con el consumo de carne de caballo: Normativa europea y control de riesgo. Eurosurveillance. 3: 90.

-
26. Maizels, R.M., Philipp, M and Ogilvie, B.M. 1982. Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunology Review*. 61: 109
 27. Mantovani, A., Filippini, I., Bergomi, S., 1980. Indagini su un epidemia di trichinellosis umana verificatasi in Italia. *Parassitologia* 22, 107-134.
 28. Murrell, D. and Bruschi, F. 1994. Clinical Trichinellosis, p. 117-150. In T. Sun (ed.) *Progress in clinical parasitology*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
 29. Ortega-Pierres M. G., Arriaga C. and Yépez-Mulia L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in México Central and South America. *Veterinary Parasitology*, 93: 201-225.
 30. Polidori, G.A., Gramenzi, F., Piergili Fioretti, D., Ferri, N., Ranucci, S., Morelli, A., Scacchia, M., Bellelli, C., Baldelli, B., 1989. Experimental trichinellosis in horses Trichinellosis. In: *Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*, Alicante, Spain, 2-6 October 1988. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press, Madrid, Spain, pp 268-274.
 31. Pozio, E., Cappelli, O., Marchesi, L., Valeri, P., Rossi, P. 1988. Third outbreak of trichinellosis caused by consumption of horse meat in Italy. *Annales of Parasitologie Humaine et comparee*. 63: 48-53.
 32. Pozio, E., Celano, G.V., Sacchi, L., Pavia, C., Rossi, P., Tamburrini, A., Corona, S., La Rosa, G., 1998. Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in mesle from a naturally infected horse. *Veterinary Parasitology*. 74: 19-27.
 33. Pozio E., La Rosa G., Murrell D. K and Lichtenfels. J.R. 1992. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal Parasitology*, 78(4):654-659.
 34. Pozio, E., Owen IL., La Rosa, G., Sacchi, L., Rossi, P., Corona, S. 1999a. *Trichinella papuae* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papuau New Guinea. *International Journal for Parasitology*. 29:1825-1839.
 35. Pozio, E., Paterlini, F., Pedarra, C., Sacchi, L., Bugarini, R., Goffredo, E. and Boni, P. 1999b. Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *Journal of Helminthology*. 73: 233-237.



-
36. Pozio E., Tamburrini A., La Rosa G. 2001. Horse trichinellosis, an unresolved puzzle. *Parasite* 8: S263-S265.
 37. Pozio, E., Tamburrini, A., Sacchi, L., Gomez Morales M.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.
 38. 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.
 39. Roberts, T., Murrell, K.D., 1993. Economic losses caused by food-borne parasitic diseases. In: *Proceedings of the symposium on Cost-Benefit Aspects of food Irradialion Processing*, IAEA/FAO/WHO, Alix-En Provence, 1-5 March, IAEA, SM-328/66, Vienna, pp 51-75.
 40. Ruitenberg E. J., Van Knapen F. and Elgersma A. 1983. Incidence and control of *Trichinella spiralis* throughout the world. *Food Technology*, 37:98.
 41. 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*. 40 (S1): 161.
 42. Salinas-Tobón M.R., Méndez-Loredo B., Alcántara-González N., Valdez-Cruz C., Martínez y Zamora R., Ortega-Pierres G., Chapa-Ruiz M.R. 1996. Class and subclass specific antibody responses to TSL-1 Antigens during *Trichinella spiralis* human infection. In: *Trichinellosis: Proceedings of the 9th International Conference on Trichinellosis*. Edited by Ortega-Pierres, G., Gamble, H.R., Knapen F. van and Wakelin D. Ed. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. pp. 453-462.
 43. Smith, H.J., Snowdon, K.E., 1987. Experimental *Trichinella* infections in ponies. *Canadian Journal Veterinary Research*. 51: 415-416.
 44. Sofronic-Milosavljevic L, Pozio E., Patrascu I.V., Skerovic N., Gomez Morales M.A., Gamble H.R. 2001. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. *Parasite*. 8: S260-S262.

-
45. Soulé C., Dupouy- Camel J., Georges P., Ancelle T., Gillet J.P., Vaissaire J., Delvigne, A., Plateau, E., 1989. Experimental trichinellosis in horses: biological and parasitological evaluation. *Veterinary Parasitology*. 31: 19-36.
 46. Soulé,C., Guillou, J.P., Dupouy-Camel, J., Vallet, C.,Pozio, E., 1993.Differentiation of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*. 79: 461-465.
 47. Soulé,C., Guillou, J.P., Vallet, C., Perret, C. and Calamel, M. 1994. *Trichinella spiralis* larvae detected by PCR in the blood of an experimentally infected horse. in: Campbell, W.C., Pozio, E and Bruschi, F. (ed) *Trichinellosis*. Proceedings of the 8 th Int. Conf. On Trichinellosis. Istituto Superiore de Sanità Press, Rome, Italy. pp. 101-104.
 48. Su X., Prestwood A. K. and McGraw R. A. 1991. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 45: 331-336.
 49. Todd, E. C. D., 1989. Preliminary estimates of cost of food borne disease in the United States. *Journal Food Prod*. 52, 595-601.
 50. Touratier L. 2001. A challenge of veterinary public health in the European Union: Human trichinellosis due to horse meat consumption. *Parasite* 8: S252-S256.
 51. Touratier, L., Boireau, P., Dupouy-Camel, J., Pages, J.P., 1999. Trichinellosis of the horse and its importance in veterinary public health. Facts and consequences. *Bolletin Mensuel de la Societe Veterinaire Pratique de France*. 83: 223-264.
 52. Uparanukraw, P., Morakote, N. 1997 Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*. 83: 52-56.
 53. Van Knapen, F. and Franchimont, J.H., 1988. *Trichinella spiralis* infection in horses. Trichinellosis. In: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis, Alicante, Spain, 2-6 October 1988. Consejo Superior de Investigaciones Cientificas Press, Madrid, Spain, pp 376-381.

-
54. Virga A., Gómez-Morales M. A., Croppo G. P. and Pozio E. 1994. Specificity of ELISA test in the diagnosis of equine trichinellosis. In Trichinosis: Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Edited by Campbell W.C., Pozio E. and Bruschi F. Istituto Superiore di Sanita Press, Rome, Italy. Pp 387-390.
 55. Viveros N., Arriaga C., Banda V., Ortega-Pierres M.G., Yépez-Mulia L. 2001. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestión, ELISA and PCR. Parasite 8: S257-S259.
 56. 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.
 57. Yépez-Mulia, L., Arriaga, C., Viveros, N., Adame, A., Benitez, E., Ortega-Pierres, M.G. 1999. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and Western blot analysis. Veterinary Parasitology. 81: 57-68.
 58. Yépez- Mulia, L., Ortega- Pierres, M.G. 1994. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la Triquinelosis. Revista Latinoamericana de Microbiología. 36: 127-138.
 59. 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.
 60. 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.