



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE TRIQUINELOSIS EQUINA POR MÉTODOS  
SEROLÓGICOS Y SU COMPARACION CON MÉTODOS  
PARASITOLÓGICOS ESTABLECIDOS**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**GARCÍA ESCAMILLA, MARCELA ISABEL**

ASESOR: YEPEZ MULIA, LILIAN

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**




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

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

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

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

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico a Internet el  
contenido de tal trabajo recepcional.  
NOMBRE: Marcela d. García Escamilla  
FECHA: 26 NOV 2014  
FIRMA: 

**Jurado asignado:**

Presidente	QFB Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	DRA. Ana Esther Aguilar Cárdenas
Secretario	DRA. Lilian Yépez Mulía
1er. Suplente	DR. Constantino III R. López Macías
2°. Suplente	DR. Enrique Ortega Soto

Sitio dónde se desarrollo 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

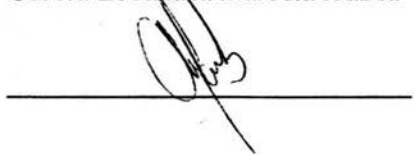
Asesor del tema:

DRA: LILIAN YÉPEZ MULÍA



Sustentante :

García Escamilla Marcela Isabel.



# DEDICATORIAS

## A Dios

Gracias, porque siempre estas conmigo y nunca me has dejado sola.

## A mis padres:

Guadalupe Escamilla Rincón y Raúl García Montes. Gracias por darme la vida. Les agradezco todo su apoyo, comprensión y cariño, les entrego uno de mis mayores logros y que sin ustedes no hubiera podido concluir. Los amo.

## A mi esposo

Te dedico este trabajo de Tesis .Gracias por compartir conmigo este momento, por tu gran amor y sobre todo por tu comprensión. Te amo.

## A mi hija

Andrea te quiero mucho eres lo mejor que me ha pasado, este trabajo es gracias a ti porque eres lo más importante en mi vida.

## A mis hermanos

Mauricio, Carlos, Adriana y Erick. Gracias por todo sin ustedes no hubiera podido llegar hasta este momento de mi vida. Los quiero mucho y que Dios los bendiga.

## A la familia Hernández Zambrano

Por todo el cariño y comprensión que siempre me han brindado y su ayuda desinteresada, así como los momentos agradables que he pasado con ustedes.

## A toda mi familia

A mis abuelos, Tíos y primos por su cariño y apoyo, en especial a mi Tía Lucre y mi prima Angeles porque siempre se han preocupado por mi familia y han estado conmigo en todo momento.

# AGRADECIMIENTOS

**A la Dra. Lilián Yépez Mulia.**

Por su paciencia y dedicación brindada en la realización de este trabajo y dame la oportunidad de trabajar con ella.

**A mis compañeros del laboratorio de Pediatría.**

Beatriz, Nayeli, Noemí y Amparo por su compañerismo en mi estancia en el laboratorio así como a todo el personal que me ayudó en la realización de este trabajo de Tesis.

**A mis amigos de Anaclim**

Rocío, Héctor, Humberto, Tere y Rosario por el gran apoyo y buenos consejos recibidos que me brindaron para la realización de este trabajo y sobre todo su amistad incondicional.

**A Beatriz**

Por su valiosa amistad y apoyo otorgados así como los consejos recibidos.

**A Rocío**

Por su invaluable amistad y todos los momentos alegres y sus acertados consejos que he recibido y sobre todo por el gran apoyo que siempre me ha brindado.

# INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
-Planteamiento del problema	1
-Objetivos	3
-Hipótesis	3
2. ANTECEDENTES	4
- <b><i>Trichinella spiralis</i></b>	5
-Epidemiología	8
-Triquinelosis en México	13
-Métodos y diagnóstico	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
-Obtención del extracto total de la larva muscular de <b><i>Trichinella spiralis</i></b>	18
-Cuantificación de proteínas del extracto total de la larva muscular de <b><i>Trichinella spiralis</i></b>	19
-Estandarización del ensayo de ELISA con sueros de caballos de rastro	20
-Separación electroforética del extracto total de la larva muscular de <b><i>Trichinella spiralis</i></b>	21
-Inmunoelctrotransferencia	21
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
6. CONCLUSIONES	35
7. ANEXOS	36
8. BIBLIOGRAFÍA	46
ABREVIATURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii

# 1.- INTRODUCCIÓN

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro país la principal fuente de transmisión de la triquinelosis es el consumo de la carne de cerdo infectada con la larva muscular de *T. spiralis*. Sin embargo, en países europeos los principales brotes de triquinelosis humana han sido ocasionados por el consumo de carne de caballo. México exporta carne de caballo a Francia y a Japón, inspeccionándose las canales para determinar la presencia de *Trichinella* en rastros Tipo Inspección Federal (TIF). Entre los rastros TIF, están los de la Unión Ganadera de Aguascalientes (U.G.A.S.A.), en donde llegan caballos provenientes de varios estados como: Nayarit y San Luis Potosí; estos rastros funcionan bajo principios sanitarios internacionales sugiriéndose la realización de la digestión artificial de diafragma y masetero como método de diagnóstico y son supervisados periódicamente por representantes de los países importadores. Sin embargo, en nuestro país existen otros rastros de caballos, los rurales, en donde no se realiza el diagnóstico de la parasitosis, siendo la carne proveniente de estos rastros consumida por una gran parte de nuestra población, debido a su bajo costo. Además, esta carne es utilizada como adulterante en longanizas, chorizos y carne para hamburguesas, como se ha demostrado en camicerías y diversos expendios de comida de la Ciudad de México ( De la Rosa y cols., 1998 ). La razón por la que no se realiza la inspección de las canales, se debe a que en México no se considera a la carne de caballo como una vía de transmisión de la triquinelosis. Sin embargo en 1995, Ariaga y cols. demostraron la presencia de *T. spiralis* en 5/80 caballos provenientes del rastro rural San Vicente Chicoloapan.

En países europeos a pesar de llevarse a cabo el diagnóstico de esta parasitosis por digestión artificial, se han presentado brotes de triquinelosis humana (Anón y cols., 1998; Haeghebaert y cols., 1998). De manera importante, cabe mencionar que en 1996, un caballo exportado por México ocasionó la infección a un número reducido de personas (Pozio y cols., 2000), posteriormente la presencia del parásito se detectó por autoridades sanitarias francesas.

El diagnóstico de los caballos por digestión artificial, es poco sensible, debido a que en estos animales se ha observado una carga parasitaria baja. Con respecto a lo anterior, en caballos infectados experimental y naturalmente con *Trichinella*, se requirió la digestión de muestras grandes de tejido (30-40 g de diafragma) con la finalidad de detectar la presencia del parásito (Arriaga y cols., 1995). Por lo que resulta de interés desarrollar métodos de diagnóstico alternos que sean más sensibles y que permitan el diagnóstico confiable de la triquinelosis equina.

En el caso del diagnóstico de triquinelosis porcina, los métodos serológicos del tipo del ELISA, empleando antígeno de excreción-secreción (E/S) ó de superficie de la larva muscular (LM) de *T. spiralis* ha resultado tener una sensibilidad y especificidad alta. Además, la inmunoelctrotransferencia (IET) se ha empleado como un método confirmatorio de animales que por ELISA fueron positivos, En este estudio los sueros de animales infectados reconocen un patrón antigénico característico (moléculas de superficie de la LM del parásito) (Arriaga y cols., 1989).

Considerando lo antes mencionado, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) podría ser una alternativa en el diagnóstico de triquinelosis equina. Es por esto que en este trabajo de Tesis nos proponemos analizar por ELISA, sueros de caballos provenientes de un rastro (TIF) y uno rural, empleando el extracto total (ET) y antígeno de E/S de la LM de *T. spiralis*.

Los sueros que resulten positivos, se confirmarán por IET. De manera paralela los diafragmas de estos caballos se analizarán por el método de digestión artificial y por PCR de diafragma y/ó lengua y sangre empleando iniciadores específicos (pPRA) para *Trichinella*. Los resultados obtenidos en este estudio por ELISA y por los otros métodos parasitoscópicos y moleculares se compararán. El análisis de los resultados permitirá evaluar el uso potencial del ELISA como método de diagnóstico de triquinelosis equina.



## **OBJETIVO GENERAL**

- ☞ Evaluar el uso potencial del método de ELISA en el diagnóstico de la triquinelosis equina en caballos infectados naturalmente con *Trichinella spiralis*

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ☞ Emplear el método de ELISA en el diagnóstico de la triquinelosis equina en sueros de caballos provenientes de un rastro TIF y uno rural empleando ET y antígeno de E/S de la larva muscular de *Trichinella spiralis*
- ☞ Comparar el método serológico de ELISA con el método directo de Digestión Artificial y el método molecular de PCR en el diagnóstico de la triquinelosis equina

## **HIPOTESIS**

- ☞ El método de ELISA permite el diagnóstico de la triquinelosis equina de manera sensible y específica.

## 2.- ANTECEDENTES

### *Trichinella*

La triquinelosis es una enfermedad parasitaria de amplia distribución mundial, causada por nematodos del género *Trichinella*, que pueden afectar a más de 150 especies de animales y también al hombre. Un solo huésped puede realizar las funciones de huésped definitivo e intermediario.

Los parásitos del género *Trichinella* no presentan estadio de vida libre. Las larvas L1 del parásito infectan el tejido muscular de los mamíferos susceptibles, localizándose fundamentalmente en los músculos estriados de mayor actividad y, por tanto, con mayor concentración de oxígeno (pilares diafragmáticos, maseteros, intercostales, linguales, oculares, entre otras). Las larvas inician un proceso de transformación de célula muscular a una estructura conocida como célula nodriza, (a excepción de *T. pseudospiralis*) en la que los parásitos pueden sobrevivir años en el tejido muscular del huésped, pero a medida que pasa el tiempo la cápsula fibrosa se espesa e inicia un proceso de calcificación.

Durante los últimos años, distintos estudios utilizando técnicas bioquímicas y moleculares (aloenzimas, Dot ELISA y Southern blots, PCR y RAPD), además de métodos biológicos, han demostrado diez genotipos diferentes en el género *Trichinella* (Appleyard y cols., 1999; Euzeby y cols., 1994, 1999; Pozio y cols., 1992, 1997, 2000; Senutaite, 1995).

En la actualidad se distinguen las siguientes especies de *Trichinella* reconocidos inicialmente como genotipos:

- **T1 (*Trichinella spiralis*)** (Owen y cols., 1835): Propia de las zonas geográficas templadas; infecta a humanos, cerdos, ratas y animales silvestres.
- **T2 (*Trichinella nativa*)** (Britov y Boev, 1972): Se encuentra en carnívoros silvestres (osos y zorros) de las zonas árticas, tiene bajo grado de infectividad

para el cerdo doméstico, y en el hombre provoca importantes síntomas digestivos, principalmente diarreas prolongadas.

- **T3 (*Trichinella britovi*)** (Pozio y cols., 1992): Es el agente etiológico en el ciclo silvestre en la mayoría de los países de la Unión Europea. Posee muy baja capacidad de reproducción en cerdos y ratas.
- **T4 (*Trichinella pseudospiralis*)** (Garvaki y cols., 1972): Afecta más a las aves que a los mamíferos, tiene muy baja capacidad de reproducción en cerdos pero muy elevada en ratas y se caracteriza por ser de menor tamaño y por no formar la célula nodriza en la musculatura del huésped.
- **T5 (*Trichinella murrelli*)** (Pozio y cols., 2000). Presentes en carnívoros salvajes de América del Norte (Euzéby y cols., 1999).
- **T7 (*Trichinella nelsoni*)** (Britov y Boev, 1972): De África tropical, se encuentra en grandes carnívoros (leones, hienas, leopardos, chitas y zorros) de la región, también se ha encontrado en el sur de Rusia, Bulgaria y Suiza. Presenta un grado bajo de infectividad para los cerdos domésticos y ratas de laboratorio, en el hombre provoca intensas infecciones con un gran número de larvas por gramo de músculo.
- **T10 (*Trichinella papuae*)** (Pozio y cols., 1999) de Papua Guinea, la cual se encuentra en cerdos y jabalíes.

Estas siete entidades de *Trichinella* están ubicadas al nivel de especies, mientras que los genotipos T6, T8 y T9 están en un nivel taxonómico incierto.

### ***Trichinella spiralis***

Es un nematodo blanquecino y filiforme, con la extremidad anterior más delgada que la posterior. La hembra mide entre 3.5 mm de largo por 0.06 mm (60u) de ancho, en tanto que el macho que es de menor tamaño, mide 1.5 mm de largo por 0.05 mm (50u) de ancho (Reveles, 1997). En su extremo anterior posee una boca pequeña, orbicular, sin papilas; el tubo digestivo es largo y angosto, el esófago consta de una parte anterior corta y muscular, y

otra posterior larga, el esticosoma. En la hembra, el extremo posterior es redondeado, mientras que en el macho presenta una curva ventral con dos apéndices caudales lobulares, con dos papilas entre ellos; carece de espícula y de vaina espicular.

*T. spiralis* (genotipo T1) es el agente típico etiológico en cerdos domésticos y salvajes. Puede ser transmitida a la fauna y adicionalmente a caballos. Todos son fuentes de infección para los humanos (Pozio y cols., 1998; Dupouy – Camet, 1999). *T. spiralis* también parece ser la especie más infectiva y persistente en huéspedes herbívoros (caballos, borregos, ganado vacuno y cabras), lo cual confirma su evolución doméstica ó sinantrópica.

El ciclo de vida de *T. spiralis* (Figura 1) empieza cuando carne infectada con la larva muscular del parásito es ingerida por el huésped, los jugos gástricos digieren la carne y las larvas quedan en libertad en el intestino, donde en un periodo de 48h se diferencian en hembras y en machos adultos.

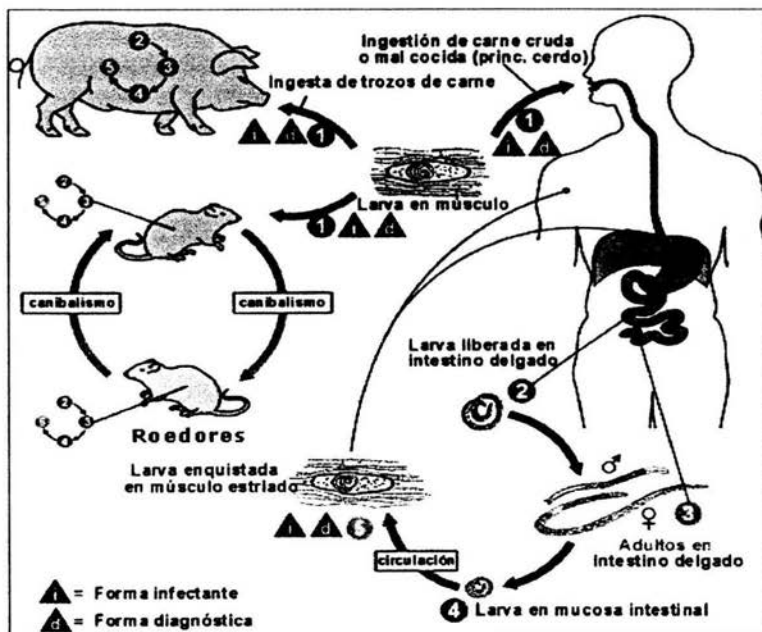
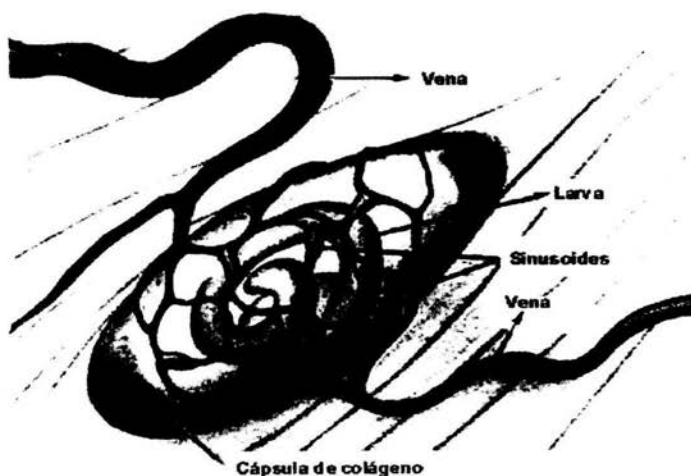


Figura 1.-Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. El ciclo doméstico incluye principalmente a cerdos y los roedores .

En el duodeno-yeyuno ocurre la copulación, después de la cual los machos mueren y son eliminados con las deposiciones del hospedero. Las hembras grávidas penetran la mucosa del duodeno y del yeyuno y liberan larvas recién nacidas (LRN), las cuales atraviesan la mucosa intestinal y, por vía de la circulación y el sistema linfático, se establecen en músculo estriado.

Las larvas recién nacidas (LRN) penetran la membrana de las células musculares y se desarrollan en LM dentro de la célula nodriza (cápsula de colágeno que protege al parásito de la respuesta inmunológica del hospedero y dentro de la cual la larva de *T. spiralis* reside) (Figura 2 ). La transformación de la célula muscular en célula nodriza se lleva a cabo en aproximadamente 20 días a partir de la entrada del parásito en la célula muscular. Esta estructura es independiente del tejido muscular y es altamente especializada ya que funciona almacenando nutrientes tanto para la célula misma como para la larva muscular (LM).



**Figura 2.- Larva muscular dentro de la célula nodriza**

Los estudios realizados por Despommier y cols. (1990) han demostrado que una molécula de 43kDa es secretada por el parásito al citoplasma de la célula muscular y que

posteriormente se localiza en los núcleos de ésta, logrando participar en la inducción y mantenimiento de la célula nodriza. En algunos hospederos, la célula nodriza puede mantener al parásito durante toda la vida del animal; en otros como el humano, esta estructura eventualmente se calcifica y tanto la célula nodriza como el parásito mueren.

En consecuencia, un mismo individuo es sucesivamente, huésped definitivo, cuando alberga en su intestino las formas adultas y es intermediario del parásito, cuando las larvas se localizan en su musculatura. Por estas características a este ciclo se le denomina autoheteroxeno.

Las larvas de *T. spiralis* en tejido del huésped muerto son menos tolerantes a temperaturas ligeramente elevadas y al frío que algunos otros genotipos silvestres.

En cerdos experimentalmente infectados por *T. britovi* y *T. spiralis* se ha demostrado que el sitio de predilección de estos parásitos son el diafragma y la lengua, los cuales pueden llegar a tener un alto porcentaje de larvas, dependiendo de la carga parasitaria.

Los síntomas gastrointestinales como el dolor abdominal, diarrea y náusea en el hombre, así como la pérdida de fluido gastrointestinal y mala absorción, se deben a la presencia del organismo adulto en el intestino del huésped. Otros síntomas como mialgias, edema orbital, fiebre y fatiga muscular se relacionan con la migración del parásito y la respuesta del huésped hacia él, una vez que se encuentra dentro de la célula muscular. La sintomatología depende en gran manera de la intensidad de la infección.

## **EPIDEMIOLOGIA**

En Estados Unidos la triquinosis es declinante. La enfermedad se notifica desde 1947, y aún se siguen presentando casos de triquinosis debido principalmente al hábito del consumo de cerdo y su forma de preparación, así como al consumo de animales salvajes como jabalíes, osos y zorros. Por ejemplo el estado de Alaska registra altas tasas de incidencia de triquinosis para los períodos 1987-1990 y 1990-1996, esto asociado al alto consumo de carne de animales salvajes (Moorhead y cols., 1999).

La frecuencia de la triquinelosis es variable en los países latinoamericanos (**Tabla 1**) y sólo en algunos países la infección tiene importancia clínica y epidemiológica. En los países del cono sur –Argentina, Chile y Uruguay-, la triquinelosis es endémica y evoluciona con brotes epidémicos esporádicos.

En algunas regiones, en las cuales la triquinelosis es endémica, la infección del cerdo es más baja y varía entre 0.14 y 0.33% (Ortega-Pierres y cols., 2000). Sin embargo, la investigación de los porcinos, con resultados negativos no indica, necesariamente, que no exista triquinelosis en determinadas regiones (Pozio y cols., 1998, 2000).

Países	Nº casos humanos (fatalidad)	Nº cerdos infectados ó prevalencia	Fuente de la infección
Argentina	1274 (3)	416	cerdos principal.
Canadá (1995)	9 (0)	2	animales salvajes
Chile (1995-97)	169 (1)	0.001%	cerdos
Chile (1998)	5 (?)	?	cerdos
México (1993-95)	282 (0)	no reportados	cerdos
USA (1995-96)	36 (0)	0.028 - 0.13%	animales salvajes

**TABLA 1:** Casos reportados de triquinelosis a la Comisión Internacional de Triquinelosis para América (1995-1997) (R.Lloyd Jones, 2000).

El consumo de la carne de cerdo se ha considerado como la fuente más importante en la transmisión de la triquinelosis, sin embargo, los brotes más graves ocurridos en Europa en los últimos 20 años (en estos brotes se han registrado más de 2600 personas infectadas

causando 5 decesos), han sido atribuidos al consumo de carne de caballo infectada con larvas del parásito del género *Trichinella* (Dupouy –Camet y cols.,1994; Ancelle, 1998; Anón, 1998; Boireau y cols.,2000) (**Tabla 2**). En Francia e Italia, cerca del 30% de la población generalmente consume carne da caballo crudo o semicocida en forma de carne tártara o carpaccio (Pozio y cols.,1997).

Los caballos que han ocasionado estos brotes eran provenientes de países no pertenecientes a la Unión Europea como países de Europa Oriental y de América del Norte (Pozio 1998; 2000). Esto llevó por parte de Comunidad Europea al establecimiento de medidas de control, considerándose obligatoria la digestión artificial de la carne de caballo, no sólo en los países donde han ocurrido los brotes, sino también en los países exportadores.

<b>PAIS (fecha)</b>	<b>No CASOS</b>	<b>FUENTE</b>	<b>ESPECIES</b>
China (1992-1996)	467	Cerdo, carnero	<i>T. spiralis</i>
España (1995)	15	Cerdo	<i>Trichinella sp</i>
Francia (1998)	126	Caballos importados	<i>T. spiralis</i>
Italia (1996)	20	Jabalí	<i>T.brütovi</i>
Italia (1998)	92	Caballos importados	<i>T. spiralis</i>
Kamchatka (1996)	49	Cerdo	<i>T.pseudospiralis</i>
Letonia(1995-1998)	255	?	<i>Trichinella sp</i>
	165	?	
Libano (1995)	200	Cerdo	<i>T. spiralis</i>
Lituania(1996-1997)	328	?	<i>Trichinella sp</i>
Polonia (1992-1997)	571	Cerdo, jablai	<i>Trichinella sp</i>
Rumania (1997)	2027	Cerdo	<i>Trichinella sp</i>



Tailandia (1994)	59	Cerdos salvajes	<i>T.pseudospiralis</i>
Tailandia (1995)	45	Cerdos salvajes	<i>Trichinella sp</i>

\*Primer reporte para Corea. Brotes recientes de triquinelosis informados por la Comisión Internacional de Triquinelosis para Europa y Asia (ICT, 1999).

**TABLA 2.-**Brotes de triquinelosis informados para Europa y Asia hasta 1999 (Comisión Internacional de Triquinelosis para Europa y Asia (ICT,1999)).

En la actualidad no se tienen datos precisos sobre la forma de cómo los caballos, siendo herbívoros llegan a adquirir esta parasitosis. Sin embargo, varios investigadores han logrado reproducir experimentalmente la infección en caballos. Estos estudios han mostrado que los caballos son susceptibles a la infección con distintas especies del género *Trichinella* que incluyen: *T. spiralis*, *T.nativa* y *T. nelsoni*, observándose mayor infectividad con *T. spiralis* (Smith y Snowdon, 1987; Polidori y cols., 1988; Soulé y cols., 1988, 1989, 1993; Gamble y cols., 1996; Voigt y cols., 1997; Yépez y cols., 1999).

Se ha sugerido (Polidori y cols., 1989; Dupoy- Camet y cols., 1994; Pozio y cols., 1997, 1999) que los caballos pueden adquirir la Triquinelosis de diferentes maneras, entre ellas:

- 1) Por pastar en campos contaminados con heces animales infectados con *Trichinella*.
- 2) Por ingestión de insectos los cuales pueden servir como huéspedes paratécnicos.
- 3) Por pastar en campos contaminados por cadáveres de roedores infectados ó desechos de cerdos y
- 4) Por ingestión de carne de cerdos y animales silvestres infectados con el parásito.

Ante este respecto, es bien conocido que durante la estación de invierno el número de roedores en los establos aumenta, además, el invierno es la estación donde los animales

carneívoros se matan por sus pieles y los cerdos también son sacrificados en las granjas, frecuentemente sin controles sanitarios ó veterinarios. Estas observaciones sugieren que los caballos adquieren la triquinelosis durante la estación fría (es decir en el periodo de engorda antes de ser sacrificados) (Soulé 1989; Polidori 1990). Lo anterior ayuda a explicar porque la detección de los caballos infectados en *Barleta* se realizó entre agosto y febrero (1990) (Pozio y cols., 1993) y la baja cantidad de IgG circulante sugiere que estos caballos pudieron adquirir la infección 8-10 meses antes de ser sacrificados (es decir durante la previa estación fría) (Pozio y cols., 1997).

Las Infecciones experimentales de caballos con *T. spiralis*, *T. britovi* y **T5** (ahora *T. murrelli*), con diferentes dosis, confirman que el caballo es un huésped susceptible para *Trichinella*, aunque la carga parasitaria disminuya después de varios meses (Soulé 1989; Polidori 1990). Sin embargo la ocurrencia de infecciones concomitantes, el embarazo y el estrés por el medio ambiente, los cuales inducen una inmunosupresión, pueden favorecer el establecimiento de un gran número de larvas en músculo de caballos infectados naturalmente, explicando la severidad de la sintomatología y las muertes durante dos brotes en Francia (1985) (Pozio y cols., 1997).

El impacto económico de la triquinelosis en humanos transmitida por carne de caballo infectado ha sido evaluada. En este contexto, Ancelle (1990) estimó un costo de \$300-4000 US por cada caso humano ocurrido en Francia en 1985, y de acuerdo a Roberts y cols., (1994), cada caso de triquinelosis humana resulta en una pérdida económica de aproximadamente \$6000 US.

Por otro lado, datos epidemiológicos han demostrado que un cadáver de caballo infectado con *Trichinella* puede ser una fuente de Triquinelosis de miles de individuos, y el control veterinario de la infección por *Trichinella* con un costo de aproximadamente \$3.0 US (Pozio y cols., 1997).

## **TRIQUINELOSIS EN MÉXICO**

En México, la triquinelosis es endémica y evoluciona con brotes epidémicos esporádicos. Estudios sistemáticos en autopsias han demostrado la existencia del parásito entre el 4 y el 15%; pero, desde el punto de vista clínico, la mayoría de los casos se presenta

con sintomatología atenuada o son subclínicos. Desde 1952 a 1997 aproximadamente 758 casos de triquinelosis humana han sido reportados en México debido principalmente al consumo de carne porcina medio cruda. Los estados de mayor endemicidad son Zacatecas, Chihuahua, Puebla, Edo. de México y D.F (**Figura 3**) (Ortega-Pierres y cols., 2000).

En el estado de Zacatecas se reportaron en un lapso de 7 años, 102 casos de triquinelosis y 158 casos en la recopilación de 10 años en el resto de la República Mexicana. En Zacatecas existe el antecedente de que los brotes de triquinelosis han sido causados por la ingesta del chorizo, elaborada con la carne de cerdo infectada con *T.spiralis*. En uno de los últimos brotes en este estado, se demostró que la gente con un rango de edad de 15 a 44 años, es el grupo más afectado y que dentro de éste, el 15% ocurrió en mujeres. Las larvas se detectaron en seis biopsias musculares (38%) y en seis casos por cortes histológicos y por inmunoelectroforesis (Cabral-Soto y cols., 1990; Ortega-Pierres y cols.,2000).

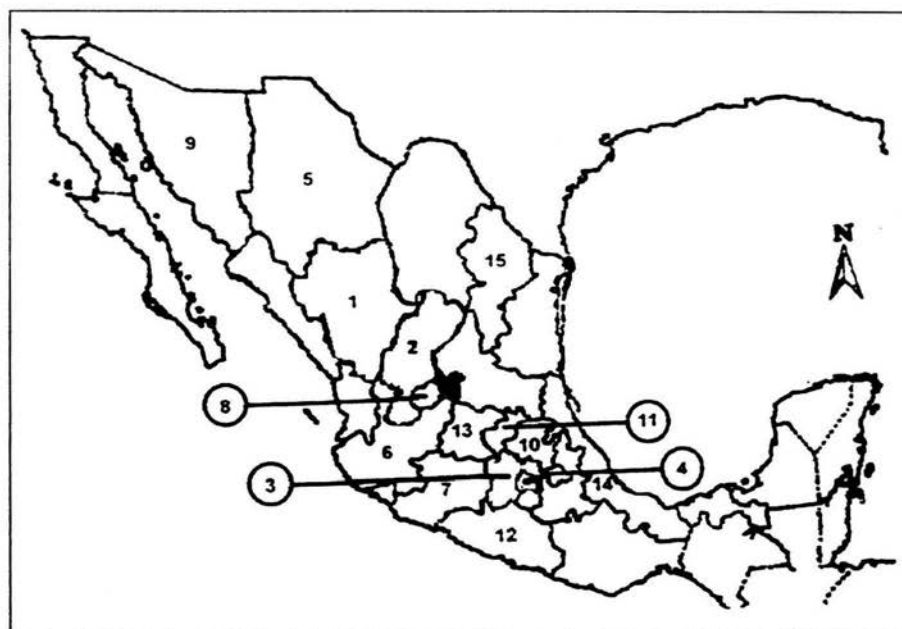
Por otro lado, Chihuahua también es considerado un estado endémico para triquinelosis. Uno de los últimos brotes documentados ocurrió en la ciudad de Delicias, Chihuahua, ocasionado por el consumo de derivados de cerdo. En esta ocasión se involucraron 166 personas y el 88.1% presentaron resultados positivos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

En la Ciudad de México, durante el periodo de 1970-1990, 8 casos de triquinelosis fueron reportados en niños, los cuales fueron hospitalizados en el Hospital de Pediatría, en donde el diagnóstico se basó en los síntomas clínicos, ensayos inmunológicos y biopsias de músculo que confirmaron la infección (Álvarez-Chacon y cols.,1992).

En un estudio serológico realizado con sueros de cerdos de traspato de tres diferentes localidades: Toluca en el estado de México, Paso de Ovejas en Veracruz y Paracho en Michoacán se encontró una prevalencia de la infección con *Trichinella* en un rango de 1 a 24% (Arriaga y cols.,1989).

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

Por otro lado, estudios realizados en el estado de San Luis Potosí con muestras de sueros de cerdo (1995), revelaron que existe una prevalencia de 1.9%, argumentando que la falta de control en la crianza, introducción y sacrificio de cerdos favorece el desarrollo de la triquinosis humana.



**Figura 3**

Distribución en México donde se han reportado brotes de triquinosis humana ó animal. En los Estados de alta riesgo se incluyen: El Estado de Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México (3) y la Ciudad de México(4). En los Estados de mediana incidencia se incluyen: El Estado de Chihuahua (5), Jalisco (6) y Michoacán (7). En los Estados de baja incidencia se incluyen: El Estado de Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14) y Nuevo León (15).

Desde 1997 no se han requerido reportes oficiales en México según la Dirección General de Epidemiología y sólo casos aislados han sido documentados (De-la-Rosa-Arana y cols., 1998). En México, hasta la fecha no se ha considerado la carne de caballo como posible fuente de transmisión de la triquinosis al hombre, por lo que debido a ello, la inspección de la carne para detectar larvas de *Trichinella* sólo se lleva a cabo en los rastros

Tipo Inspección Federal (TIF). De este tipo de rastros se exportan las canales a países como Francia y Japón.

La presencia de *T. spiralis* se detectó en 5 caballos (6%) del rastro rural 5 de Junio, San Vicente Chicoloapan, Estado de México (Arriaga y cols., 1995). La detección se realizó con la digestión de 22-40g de diafragma de 80 caballos.

## **METODOS DE DIAGNOSTICO**

En los países en vías de desarrollo, el método de inspección en los rastros es la técnica de triquinoscopía; en donde se observa directamente la LM en biopsias de músculos. Este método tiene varias limitaciones ya que el tamaño de la muestra es pequeña y restringe la detección de las larvas aún en animales con cargas parasitarias altas. La triquinoscopía tiene una sensibilidad de detección de 3-10 larvas por gramo de carne analizada (Tourier,1991).

De acuerdo a lo reglamentado por la Comunidad Europea el diagnóstico de la triquinelosis equina debe realizarse por triquinoscopía y digestión artificial . Estos procedimientos definidos por las regulaciones internacionales de la Comunidad Económica Europea (77/96/EEC, 84/319/EEC, 89/321/EEC), especifican que la cantidad de carne requerida es de 1g por cerdo, en una mezcla de 100g sin embargo, debido a la presencia de más brotes de triquinelosis, la misma Comunidad Europea en 1994, propuso analizar por digestión artificial 5 g de muestra de cada canal en lugar de 1 g, como anteriormente se realizaba (94/60/EC). Así, se adoptó la inspección de carne de caballo, no sólo en países donde se han descrito los brotes sino también en países exportadores de carne de caballo como los del este de Europa y México (Ramisz y Balicka, 1994).

Sin embargo, se siguieron presentando brotes de triquinelosis, en Piacenza, Italia y Toulouse, Francia durante enero y marzo de 1998 respectivamente, que involucraron a cerca de 600 personas (Anón, 1998; Haeghebaert y cols., 1998). Esto puede deberse a que generalmente en los caballos la carga parasitaria es baja, lo cual contribuye a la baja detección del parásito mediante estos métodos (Soulé y cols.,1989,1993; Yépez y cols.,1999).

Se han realizado varios estudios en donde se han examinado varias muestras de carne de caballo utilizando las técnicas de rutina y sólo cuando se utilizan cantidades muy grandes de tejido 35g (Boni y cols., 1989), 22-40g (Arriaga y cols.), 1995, 100g (Poizio y cols., 1997) se han encontrado larvas de *Trichinella* en diferentes músculos.

De esta manera en la detección de *Trichinella* en caballo además de que la sensibilidad del diagnóstico directo depende de la cantidad de tejido examinado, es la zona de procedencia anatómica del tejido (la lengua, los músculos maseteros y abdominales.). A este respecto, se han realizado infecciones experimentales en caballos empleando 10,000 y 40,000 LM de *T. spiralis*, detectándose por digestión artificial y triquinoscopia un mayor número de LM en masetero comparado con lengua, mientras que en animales infectados con 10,000 ó 40,000 larvas musculares, la lengua presentaba un mayor número de larvas. De esto se deduce que la lengua es el sitio de predilección del parásito en infecciones con carga parasitaria baja, luego el masetero seguido del diafragma (Gamble y cols., 1996).

El hecho de que sigan ocurriendo brotes en Europa ocasionados por el consumo de carne de caballo, a pesar de las medidas de control establecidas a partir de 1985, reafirma que los métodos utilizados hasta ahora como la triquinoscopia o la digestión artificial no permiten identificar todos los animales infectados.

Por otro lado, recientemente, se ha evaluado la utilización de la técnica de amplificación de DNA (PCR) del parásito para el diagnóstico de infecciones por *Trichinella*, empleando oligonucleótidos complementarios a una secuencia repetida de DNA de *T. spiralis* (1.7Kb), pudiéndose detectar específicamente infecciones con este parásito y se ha sugerido como un método de diagnóstico en la triquinosis equina (Dupouy-Camet y cols., 1991 ; Dick y cols., 1992; Soulé y cols., 1994; Uparanukraw y cols., 1997). La ventaja de esta técnica es la determinación del material genético del parásito que indica la presencia precisa de éste en el hospedero. Una desventaja de la utilización de este método en rastro es su alto costo.

Estudios realizados hasta ahora muestran que los métodos serológicos como la IET y ELISA, empleando antígenos definidos del parásito, son útiles en el diagnóstico de la

triquinelosis porcina y humana, ofreciendo perspectivas para su aplicación en el diagnóstico de la triquinelosis equina.

Yépez-Mulia y cols. (1999) realizaron una infección experimental en caballos con 40,000 LM y 30,000 LM de *T. spiralis*, observando que a la 3ª semana post-infección (p.i.) hay un incremento en el título de anticuerpos y el mayor título se observó entre la 19ª y 15ª semana p.i., disminuyendo y manteniéndose bajo hasta la semana 27ª p.i.. Por otro lado, Soulé y cols. (1993), observaron en caballos que recibieron una dosis infectiva de 50,000 LM que el pico de anticuerpos específicos es entre la 3ª y la 6ª semana p.i. y una disminución después de la 20ª semana p.i., no detectándose después de la semana 25ª p.i..

En el empleo de los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) como método de diagnóstico de triquinelosis equina se debe considerar la información obtenida experimentalmente, ya que existe la posibilidad de que en caballos con infección tardía no se detecten niveles importantes de anticuerpos. Además, debe hacerse una correlación del ELISA con los métodos parasitológicos existentes.

Por otro lado, la IET en triquinelosis porcina ha sido empleada como un método confirmatorio para aquellos animales positivos por ELISA (Arriaga y cols., 1989), de tal forma que por IET se observa con los sueros de los animales infectados con *T. spiralis* un patrón de reconocimiento antigénico de la larva muscular que incluye bandas con pesos moleculares de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa que corresponden a los antígenos de superficie de la LM del parásito.

El análisis de caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* mediante IET ha mostrado que a partir de la semana 3 p.i. y hasta la semana 19 p.i. existe un reconocimiento mayoritario de moléculas de superficie del parásito (Viveros y cols., 2001). Por lo anterior, es posible que la IET pueda también ser empleada como método confirmatorio de la infección.

### 3.- MATERIAL Y METODOS

#### MATERIAL BIOLÓGICO

Se colectaron 80 muestras de sueros de caballos que provenían del rastro 5 de junio SA de CV (UTICA) de San Vicente Chicoloapan en Texcoco, Estado de México, del 30 de Mayo al 30 de Septiembre de 1994. Del rastro TIF de la unión ganadera de Aguascalientes (U.G.A.S.A.) en Aguascalientes, Aguascalientes se colectaron 90 sueros de caballo del 30 de mayo al 1° de agosto de 1998.

Los caballos del rastro TIF provenían de Tuxpan y Acaponeta, Nayarit y del municipio de Salinas y Charcas ,San Luis Potosí.

Los caballos del rastro rural se sabe que llegan de diferentes regiones del sur de la República Mexicana principalmente de Veracruz.

#### **OBTENCIÓN DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis***

El extracto total (ET) de la larva muscular (LM) de *T. spiralis* se obtuvo de acuerdo al método descrito por Parkhouse (1981). La extracción se realizó a partir de un paquete de 0.5mL de larvas musculares, las cuales se resuspendieron en un volumen de Tris (20mM, pH 8.3), conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 2mM, diluído en isopropanol, TLCK 25g/mL, diluído en agua, TPCK 50ug/mL, diluído en etanol Sigma, St. Louis, Mo. EUA). La homogenización se llevó a cabo por 30 min en un homogenizador de vidrio (Potter Weheaton) en un baño de hielo. Posteriormente, se añadió desoxicolato de sodio (DOC) (Sigma, St. Louis, Mo. EUA) al 4% y se homogenizó 20 min más, dejando reposar 30 min temperatura ambiente. El extracto se centrifugó a 13500g por 30 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf (modelo 5415c, Alemania) y el sobrenadante se guardó a 4°C para su posterior cuantificación de proteínas .



Los antígenos de excreción-secreción (E/S) fueron donados amablemente por el Dr Ray Gamble, Parasite Biology and Epidemiology Laboratory, USDA, Agricultural Research Service, USA. .

### **CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis***

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry (1951) con algunas modificaciones. Para hacer la curva patrón, diferentes concentraciones de albúmina (fracción V. Sigma, St. Louis, Mo. EUA) fueron empleadas (10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL). El protocolo empleado se describe a continuación:

<i>TUBO</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<b>a)ASB (uL)</b>	-	10	20	40	60	80	100	-
<b>H<sub>2</sub>O (uL)</b>	500	490	480	460	440	420	400	490
<b>Muestra (uL)</b>	-	-	-	-	-	-	-	10
<b>b)Detergente (uL)</b>	50	50	50	50	50	50	50	50
<b>c)sol. E (uL)</b>	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

**a) Volúmenes tomados a partir de un stock de albúmina (1 mg/mL )**

**b) Solución de DOC al 10%**

**c) Solución preparada a partir de mezclar un volumen de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5% y un volumen de tartrato de sodio y potasio al 2%, más 50 volúmenes de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1N**

Se mezcló el contenido de cada tubo y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 250uL del reactivo de Folin-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido 1:2 y 500uL de Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Bio-Rad, Hércules, CA. EUA) al 5%. Los tubos se agitaron en un vórtex y se incubaron

30 min a temperatura ambiente. Una vez realizado este procedimiento, se leyó la absorbancia a 750nm ,en un espectrofotómetro. La concentración de proteínas de los ET se calculó por interpolación con la curva patrón de albúmina.

## **ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE ELISA CON SUEROS DE CABALLOS DE RASTRO**

El ensayo de ELISA se realizó siguiendo el método descrito previamente por Arriaga y cols. (1989). Para estandarizar el ensayo se seleccionaron algunas muestras de suero de caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* y muestras de sueros de caballos que por IET y Digestión artificial resultaron negativos. Las placas de ELISA se sensibilizaron con el ET de la LM de *T. spiralis* a una concentración de 20mg/mL en amortiguador de carbonatos. El acoplamiento se llevó a cabo incubando la placa toda la noche a 4° C. Posteriormente los sitios en los que no se adhirió el antígeno se bloquearon con PBS-Tween-20 al 0.5%-albúmina 0.5% a temperatura ambiente por 1h. Las diferentes diluciones de los sueros se realizaron en PBS-Tween-20 al 0.5% y albúmina 0.5% y se incubaron 1h a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0.5% durante 3 min 3 veces, enseguida se agregaron 100uL del conjugado de conejo anti IgG de caballo acoplado a peroxidasa diluido 1:10000 en PBS-Tween-20 (0.5%)-albúmina (0.5%). La placa se incubó 1h a 37° C y posteriormente se lavó con PBS-Tween-20(0.5%) como anteriormente se mencionó. Una vez realizado lo anterior, se adicionaron 200uL por pozo de amortiguador citrato-fosfato con 4mg/mL de o-fenildiamina y 4uL de H2O2 al 30% y se dejó desarrollar color por 5min. La reacción se paró adicionando 50uL de H2SO4 2.5M a cada pozo. La densidad óptica se leyó a 492nm en el lector de ELISA. También se realizó el ELISA empleando como fuente de antígeno los productos de E/S de la LM de *T. spiralis* a una concentración de 5ug/mL. De acuerdo a los resultados de la estandarización se procedió a emplear los sueros de caballos a una dilución 1:400 con el ET y1:20 cuando se emplearon los antígenos de E/S.

## SEPARACIÓN ELECTROFORETICA DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

El ET de la LM de *T. spiralis* se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS empleando una cámara de electroforesis miniprotean (Bio Rad) (CA. EUA.). Para la preparación de los geles se colocó el gel espaciador al 10% entre los vidrios, inmediatamente se adicionó 1ml de isopropanol. Después se lavó y se colocó un peine ciego, adicionándose el gel concentrador al 5%. Al ET de *T.spiralis* se le agregó 500uL amortiguador de muestra (**Anexo A**) y beta-mercaptoetanol, se hirvió por 3 min y se mantuvo en frío hasta que se cargaron los geles. Estos se corrieron con amortiguador de corrida (**Anexo A**) a 100 V hasta que la muestra entró al gel espaciador, después de lo cual se aumentó el voltaje a 140 V y se dejó correr por espacio de 2 h.

En el análisis electroforético se incluyeron marcadores Bio-Rad de bajo y alto peso molecular. Una vez transcurrido el corrimiento electroforético una porción del gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.1% y se destiñó posteriormente con ácido acético al 7.5% y metanol al 50% con la finalidad de comprobar la integridad de la muestra.

## INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Una vez realizada la separación electroforética del ET de la LM de *T. spiralis*, el gel de poliacrilamida se equilibró en amortiguador de transferencia (**Anexo A**) por 30 min a temperatura ambiente con dos cambios de solución cada 15 min. La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se llevó a cabo en una cámara de transferencia a 100 V, durante 1h a 4° C (**Anexo B**). Después de la transferencia, se cortó la tira de papel de nitrocelulosa en donde se encontraban transferidos los pesos moleculares y se tiñó con Amido negro al 0.1%, durante 3min y posteriormente se destiñó con una solución con ácido acético al 7.5% y metanol al 50%. El resto del papel se bloqueó con una solución de PBS-ASB al 3% a 4°C toda la noche. Una vez realizado lo anterior, se cortó el papel en tiras de aproximadamente 4mm. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron toda la noche a 4 ° C con los sueros de caballos de rastro diluidos 1:10 en una solución de incubación que contenía 100ul de PBS 10X, 100uL de suero de temera descomplementado (STD) y 100uL de la solución

stock 10X (**Anexo A**) en agitación constante en un agitador de balanceo. Como controles positivos se incluyeron sueros de caballos infectados experimentalmente y como controles negativos sueros de caballos no infectados, a la misma dilución. Posteriormente las tiras se lavaron 3 veces por 10 min con PBS-Tritón X-100 al 1%. Enseguida se adicionó el conjugado de conejo anti- IgG de caballo acoplado a peroxidasa diluido 1:5000 en PBS-STD 10%. Las tiras se incubaron 2h a 37° C en agitación constante. Posteriormente se hicieron los lavados descritos con anterioridad y se agregó la solución de sustrato (20ml de PBS, 4ml de stock (4-Cl-1-naftol en metanol absoluto:3mg/ml) y 8ul de peróxido de hidrógeno al 30% dejándose aproximadamente 10 min y parándose la reacción con agua.

En los criterios de selección de las muestras para la realización del ensayo de inmunoelectrotransferencia (IET) se escogieron algunos de los sueros que resultaron positivos con ELISA así como algunos sueros negativos.

Estudios paralelos de PCR de diafragma y/o lengua y sangre de algunos de los caballos del rastro TIF y del rural fueron realizados por la M. en C. Noemí Viveros y la Química Farmacéutica Bióloga Edith González Limón.

## 5.- RESULTADOS

Por ELISA se analizaron 80 sueros provenientes de caballos del rastro rural 5 de junio de San Vicente Chicoloapan en Texcoco, Estado de México y 90 sueros de caballos del rastro Tipo Inspección Federal (TIF) de Aguascalientes. En el ELISA se emplearon 2 preparaciones antigénicas: el ET y los antígenos de excreción-secreción de la larva muscular de *T. spiralis*. El extracto total se utilizó a una concentración de 20mg/mL y los antígenos de E/S a 5ug/mL. Los sueros se diluyeron 1:400 y 1:20 cuando se analizaron empleando el ET y los antígenos de E/S respectivamente.

Para determinar el punto de corte ( $\bar{x} + 2 DS$ ) se incluyeron sueros de caballos que en estudios previos resultaron negativos por digestión artificial y por IET no se observó reconocimiento de los componentes de la LM de *T. spiralis*. El punto de corte obtenido con los sueros controles fué de 0.348 para el ET y de 0.732 para los antígenos de E/S (Tabla 3).

	<b>ELISA D.O.(492nm)</b>	
<b>#SUERO</b>	<b>EXTRACTO TOTAL</b>	<b>ES</b>
1	0.211	0.490
2	0.228	0.344
3	0.278	0.575
4	0.155	-
5	0.133	0.254
6	0.324	0.603
7	0.292	0.578
8	0.236	0.547
9	0.168	0.276
$\bar{x}$	<b>0.225</b>	<b>0.484</b>
DS	0.061	0.124
Punto de corte (X+2DS)	<b>0.348</b>	<b>0.732</b>

**TABLA 3. Punto de corte obtenido con sueros de caballos negativos por digestión artificial e Inmunoelctrotransferencia (Estos sueros se colectaron en un estudio previo).**

De los sueros de los caballos del rastro TIF analizados por ELISA con ET de *T. spiralis*, 4/90 (4.4%) tuvieron valores de Densidad Óptica (D.O.) igual ó mayor al punto de corte (0.348). Cuando se analizaron los sueros diluídos 1:20, empleando los antígenos de E/S, 1/90 (1.1%) tuvieron valores de D.O. igual ó por arriba del punto de corte (0.732). Es importante mencionar que este suero positivo no resultó positivo con el ET (Anexo A, Figura 6). Los valores de D.O. obtenidos para el suero de caballo infectado experimentalmente fue de 1.180 a la semana 8 p.i. y 0.432 a la semana 28p.i. para el ET y de 1.232 a la semana 5 p.i. y 0.890 a la semana 28 p.i. para los antígenos E/S.

Por Inmunolectrotransferencia (IET) se analizaron las muestras que por ELISA (ET ó E/S ) resultaron positivas (Tabla 4). En el análisis de los 4 sueros positivos con ET, uno de ellos mostró reactividad hacia los componentes de la larva muscular de *T. spiralis*, con pesos moleculares de 47, 52, 59, 72 y 105 kDa (suero No.66), los demás no reconocieron componentes de la LM del parásito.

En el análisis por IET del suero positivo con E/S, éste reconoció moléculas de 47, 52 y 67 kDa (suero No.86). En el análisis por IET se incluyeron sueros (11) que fueron negativos por ELISA (ET y E/S). Como puede observarse en la Tabla 5, la mayoría de éstos también reconocieron componentes del parásito y en algunos casos con pesos moleculares similares a los reconocidos por los sueros positivos por ELISA. Como control positivo se incluyó un suero de caballo infectado experimentalmente con *T. spiralis*, el cual reconoció bandas con pesos moleculares de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa.

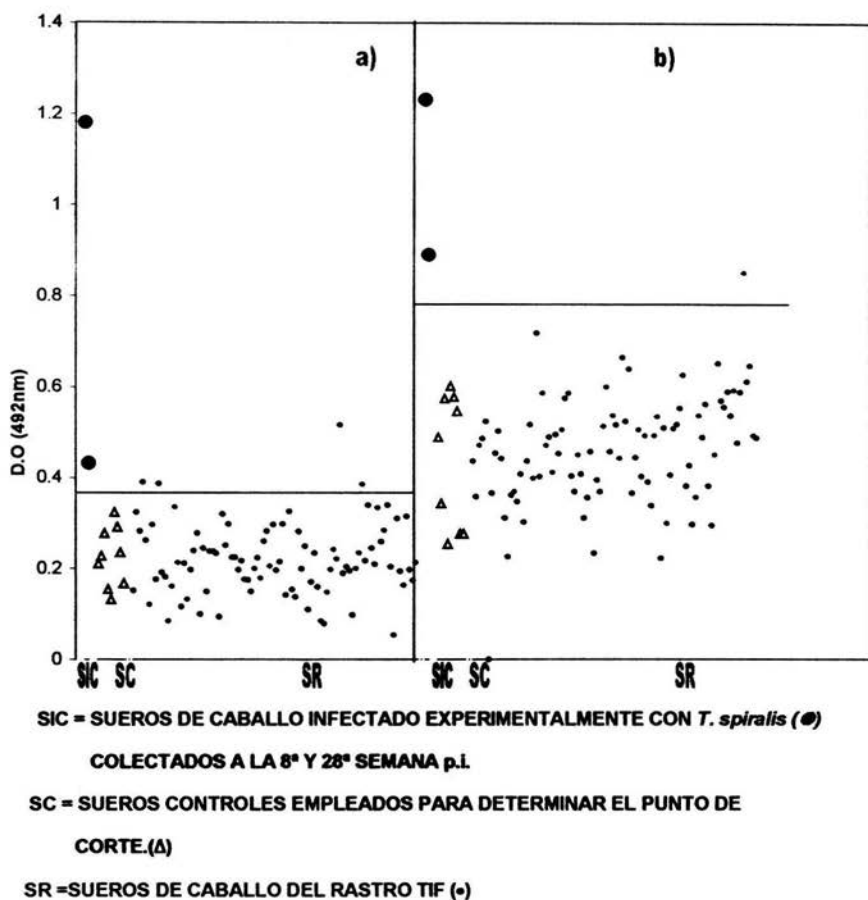


Figura 6 .-Resultados de ELISA de los sueros de caballos del rastro TIF empleando ET (a) y E/S (b). En la Figura se señala el punto de corte considerando el promedio de los sueros controles más 2 desviaciones estándar.

**TABLA 5. RESULTADOS DE LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LOS SUEROS DEL RASTRO POSITIVOS Y NEGATIVOS POR ELISA (ET y/o E/S)**

# SUERO	ELISA D.O.		IET PESOS MOLECULARES DE LAS BANDAS RECONOCIDAS(kDa)
		(492nm)	
1	0.152	0.437	NR
2	0.324	0.358	47,72
4*	0.390	0.487	NR
9	0.387	0.503	NR
14	0.336	0.371	47,105
21	0.278	0.719	43,72,105
31	0.298	0.587	47,59,94,105
50	0.325	0.639	NR
58	0.233	0.493	105
65	0.221	0.517	47,52,94
66*	0.516	0.553	47,52,59,72,105
68	0.203	0.381	43,47,52,105
73*	0.386	0.489	NR
75	0.339	0.382	NR
78	0.334	0.651	NR
81	0.339	0.589	47,67,105
84	0.310	0.477	47,105
86*	0.164	0.851	47,52,67
87	0.314	0.611	47,52,59,94,105

NR = No hubo reconocimiento de componentes de la LM de *T. spiralis*

**\* Sueros positivos por ELISA**

Los resultados del ensayo de ELISA con los sueros de caballos del rastro rural se muestran en el Anexo B y Figura 7. Cuando se usó ET, 22/80 sueros (27.5%) tuvieron valores iguales o por encima del punto de corte calculado. Sólo un suero (No. 101) (1.2%) resultó positivo con los antígenos de E/S. Este suero también dió positividad con el ET.

El análisis por IET (Tabla 5) de 14 sueros positivos por ELISA (ET y/o E/S) evidenció el reconocimiento de diferentes componentes de la LM de *T. spiralis*, con pesos moleculares de 43, 47, 52, 59, 67, 72, 79, 94 y 105 kDa. 10 sueros reconocieron de 1 a 6



bandas y los 4 restantes no mostraron reactividad. El suero 101 positivo con ET y E/S reconoció 5 bandas de 47, 52, 59, 72 y 105 kDa. De los sueros negativos por ELISA, 7/11 también reconocieron componentes de la LM, con pesos moleculares de 47, 52, 59, 94 y 105 kDa. El control positivo reconoció bandas con pesos moleculares de 47, 52, 67, 72 Y 105 kDa.

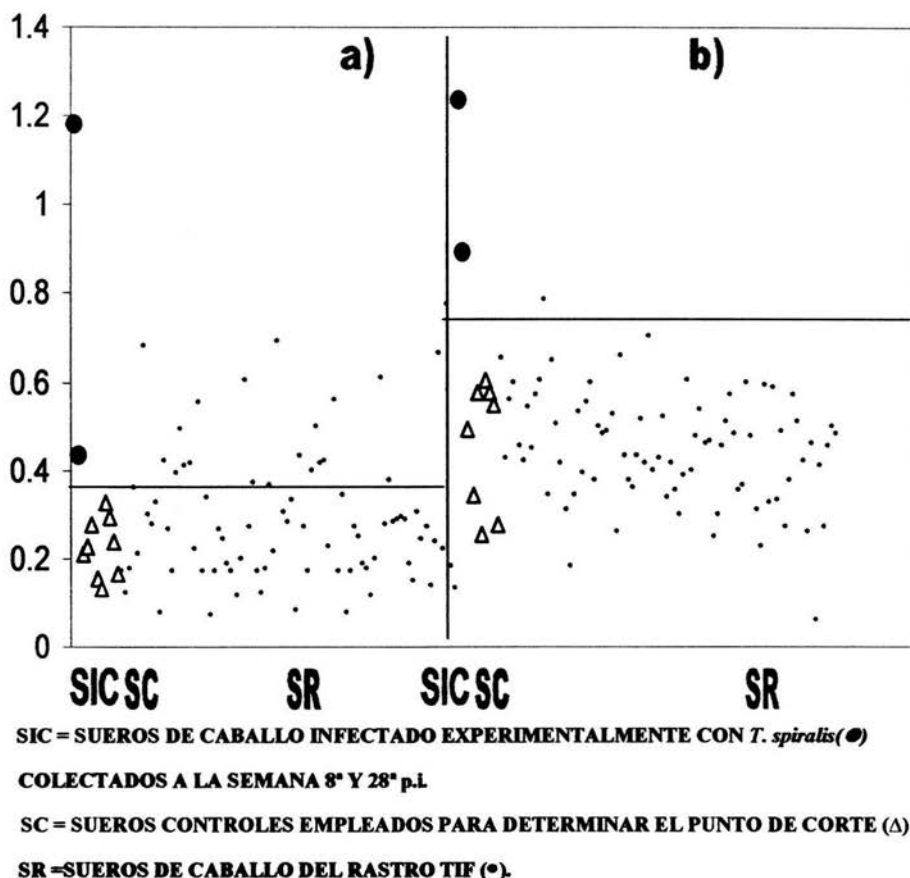


Figura 7. Resultados de ELISA de los sueros de caballos del rastro rural empleando ET (a) y E/S (b). En la figura se señala el punto de corte calculado a partir del promedio de los sueros controles más 2 desviaciones estándar.

# SUERO	ELISA D.O.(492nm)		IET
	ET	ES	PECOSMOLECULARES DE LAS BANDAS RECONOCIDAS (kDa)
93	0.175	0.516	105
98	0.277	0.448	47,52,105
101*	0.422	0.786	47,52,59,72,105
102	0.264	0.343	NR
104*	0.391	0.504	NR
105*	0.492	0.414	47,52,94,105
106*	0.412	0.311	43,94,105
107*	0.417	0.185	NR
108	0.221	0.343	NR
109*	0.552	0.530	NR
110	0.169	0.393	47,52,105
111	0.338	0.553	NR
115	0.241	0.483	47,52,59,94
117	0.173	0.527	NR
121	0.272	0.378	47
123	0.172	0.434	47,52
128*	0.692	0.426	47
136*	0.398	0.400	NR
137*	0.499	0.477	47,52,105
138*	0.416	0.536	47,52,59,72,79,94,105
139*	0.422	0.457	47,52,105
141*	0.561	0.250	67,94
146	0.271	0.481	52,105
152*	0.606	0.227	47,52

NR = No hubo reconocimiento de los componentes de la LM de *T. spiralis*

\* Sueros positivos por ELISA

**TABLA 5.** Resultados de la Inmunolectrotransferencia de los sueros del rastro rural positivos y negativos por ELISA (ET y/o E/S)

En la **Tabla 6** se presentan los resultados obtenidos con 54 muestras de caballos del rastro TIF y del rural analizadas por digestión artificial, ELISA (ET y/o E/S), IET y PCR de diafragma ó lengua y de sangre de las mismos caballos.

No. DE CABALLO	DIGESTION ARTIFICIAL	ELISA		PCR DIAFRAGMA O LENGUA	PCR SANGRE
		EXTRACTO TOTAL	E/S		
2	NEG	NEG	NEG	NEG	
4	NEG	POS	NEG	NEG	
9	NEG	POS	NEG	NEG	
31	NEG	NEG	NEG	NEG	
58	NEG	NEG	NEG	NEG	
64	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
65	NEG	NEG	NEG	NEG	
66	NEG	POS	NEG	NEG	
67	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
68	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
69	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
73	NEG	POS	NEG	NEG	
84	NEG	NEG	NEG	NEG	
86	NEG	NEG	POS	NEG	POS
87	NEG	NEG	NEG	NEG	
93	NEG	NEG	NEG	NEG	
94	NEG	POS	NEG	NEG	
96	NEG	POS	NEG	NEG	
98	NEG	NEG	NEG	NEG	
101	NEG	POS	POS	NEG	
104	NEG	POS	NEG	NEG	
105	NEG	POS	NEG	NEG	
106	NEG	POS	NEG	NEG	
107	NEG	POS	NEG	POS	
109	NEG	POS	NEG	NEG	
110	NEG	NEG	NEG	NEG	
115	NEG	NEG	NEG	NEG	
120	NEG	POS	NEG	NEG	
122	NEG	POS	NEG	NEG	
123	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
125	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
126	NEG	POS	NEG	POS	
127	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
128	NEG	POS	NEG	POS	
129	NEG	NEG	NEG	POS	
133	NEG	POS	NEG	NEG	
136	NEG	POS	NEG	POS	NEG
137	NEG	POS	NEG	NEG	
138	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
139	NEG	POS	NEG	NEG	
141	NEG	POS	NEG	NEG	
146	NEG	NEG	NEG	POS	
147	NEG	NEG	NEG	POS	
148	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
149	NEG	NEG	NEG	POS	
150	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
152	NEG	POS	NEG	NEG	POS
153	NEG	NEG	NEG	POS	
154	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
155	NEG	NEG	NEG	NEG	POS

157	NEG	NEG	NEG	POS	
166	NEG	POS	NEG	NEG	POS
168	NEG	POS	NEG	POS	POS
170	NEG	NEG	NEG	POS	NEG

**POS = POSITIVO**

**NEG = NEGATIVO**

**TABLA 6.** Resultados del análisis de muestras de caballos del rastro TIF y del RURAL positivos para *T. spiralis* por digestión artificial, ELISA y PCR de diafragma ó lengua y sangre.

Del análisis de estos resultados se pone de manifiesto que de 27 caballos positivos por ELISA (ET y E/S), 5 fueron también positivos por PCR de diafragma ó lengua (No.107, 126, 128,136 y 168), y solo 4 caballos resultaron positivos por PCR de sangre (No.86, 152, 166 y 168), siendo 3 de ellos positivos por ELISA con ET y sólo 1 con E/S. Cabe mencionar que el caballo 168 fue positivo por ELISA (ET) y PCR de diafragma y sangre. Por PCR de diafragma ó lengua en 16 caballos (No. 64, 67, 68, 69, 123, 125, 127, 129, 146, 147, 148, 149, 150, 153, 157 y 170), se detectó el ADN del parásito, pero fueron negativos por ELISA (ET ó E/S). Todas las muestras de caballos fueron negativas por Digestión Artificial, aún cuando se analizaron 30g de diafragma.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La carne de cerdo infectado con larvas musculares de *T. spiralis* se ha considerado por mucho tiempo como el principal mecanismo de transmisión de la triquinelosis a humanos. Sin embargo, desde 1985 en países Europeos como Francia e Italia se ha puesto de manifiesto que el consumo de carne de caballo infectado con el parásito es otra vía de transmisión de la enfermedad a humanos.

La Comunidad Europea dispuso a raíz de los brotes de triquinelosis por consumo de carne de caballo, que se realizara la inspección del parásito por digestión artificial en caballos de rastro así como de los caballos de importación ó exportación. Sin embargo, a pesar de estas medidas se siguen presentando brotes de triquinelosis por consumo de carne de caballo.

Varios estudios (Arriaga y cols., 1995; Pozio y cols., 1997, 1998, 1999; Anón y cols., 1998; Haeghebaert y cols., 1998) han evidenciado que la carga parasitaria en caballos es baja, por lo que el método de digestión artificial no es lo suficientemente sensible. En México, se ha demostrado que en caballos de rastro que fueron negativos por digestión artificial, por PCR de diafragma, se amplificaron secuencias específicas del parásito, sugiriéndose la presencia de *T. spiralis* (Arriaga y cols., 1995; Viveros y cols., 2001).

En general, el diagnóstico de triquinelosis equina por métodos directos (digestión artificial o triquinoscopia) ha sido difícil, debido a que como se mencionó, los caballos presentan infecciones con un bajo número de larvas y la cantidad de muestra analizada ha sido pequeña (5g), además de que se ha realizado el análisis de tejidos diferentes a los de predilección del parásito (Gamble y cols., 1996; Pozio y cols., 1998, 1999).

En este estudio de Tesis, se pone de manifiesto que aún la digestión artificial de 30g de diafragma de los caballos de rastro no permitió la detección del parásito.

Los resultados de ELISA (ET) obtenidos mostraron una positividad del 4.4% en el rastro TIF y del 27.5% en el rastro rural. El mayor número de muestras positivas en el rastro rural, pudiera deberse a que los caballos sacrificados en este rastro provienen del sureste del país, en donde las condiciones higiénicas no son buenas. A este respecto, podemos

mencionar que en países del Este de Europa, donde las condiciones higiénicas se han visto deterioradas por la guerra, se ha observado un incremento de la triquinosis tanto humana como porcina y equina.

Con respecto a las preparaciones empleadas, un mayor número de caballos resultaron positivos con ET y sólo uno (No 101) fue positivo con ambas preparaciones. La baja especificidad y sensibilidad de los antígenos de E/S que ha sido reportada en el diagnóstico de la triquinosis equina (Sofronic-Milosavljevic y cols., 2001; Pozio y cols., 2002), pudiera explicar los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, Pozio y cols. (2002) demostraron que anticuerpos IgG anti *T. spiralis* permanecen detectables en el suero de caballos infectados sólo entre 22 y 33 semanas p.i., por lo que caballos con infecciones tardías podrían considerarse falsos negativos por ELISA. Lo anterior explicaría los resultados obtenidos por ELISA y por PCR de músculo ó sangre (**Tabla 6**) en donde sólo se pudo confirmar la presencia del parásito en 9/27 (33%) caballos positivos por ELISA (ET y/ó E/S) y 16/54 (29.6%) fueron positivos por PCR pero negativos por ELISA . Es probable que estos últimos caballos albergaran infecciones con más tiempo y que al estar el parásito en músculo, los niveles de anticuerpos sean muy bajos y den resultados negativos por ELISA.

Es posible que productos de la LM del parásito induzcan una inmunosupresión del hospedero, de tal forma que en esta etapa de la infección en músculo, los niveles de anticuerpos sean bajos, sin embargo por PCR puede detectarse el ADN del parásito. A este respecto, Gerencer y cols. (1992) demostraron que los antígenos de E/S de *T. spiralis* inhibían la respuesta *in vivo* e *in vitro* de linfocitos de cerdos.

Así, caballos positivos por ELISA y PCR posiblemente sean infecciones relativamente recientes, de tal forma que todavía haya niveles detectables de anticuerpos y el parásito esté invadiendo el músculo (diafragma ó lengua) del hospedero (caballos No. 107, 126 y 128). Desafortunadamente la sangre de estos caballos no se analizó por PCR, con lo que se hubiera permitido determinar si efectivamente se trata de infecciones tempranas. Por otro lado, las muestras No. 86,152, 166 y 168 fueron positivas por ELISA y por PCR de sangre, pero negativas por PCR de diafragma, sugiriendo que efectivamente eran

infecciones tempranas, donde la LRN del parásito se detectó en sangre. El caballo 168 positivo por ELISA y PCR de diafragma y sangre debe de haber albergado una infección donde el parásito empezaba a invadir músculo.

También estos resultados muestran que los caballos positivos por ELISA empleando ET, fueron positivos por PCR sangre, apoyando lo sugerido por Pozio y cols. (2002) en cuanto a la mayor sensibilidad conferida por el ET al ensayo de ELISA, contrario a lo observado en cerdos, donde los antígenos de E/S confieren al ELISA mayor especificidad y sensibilidad (Yépez-Mulia y cols., 1994).

Con respecto al análisis de los resultados de la IET, a diferencia de lo que sucede en cerdos, los sueros de caballo tienen reacciones inespecíficas, ya que hubo 17/25 sueros que por ELISA fueron negativos pero que por IET reconocieron componentes de la LM del parásito, además de que 7/25 sueros que por ELISA fueron positivos, pero no tuvieron reactividad hacia estos componentes. Un aspecto de interés es que el patrón de reconocimiento antigénico característico de sueros de cerdos y humanos infectados con *T. spiralis*, no se observó en las muestras de caballos que por ELISA fueron positivos, ya que en algunos de éstos, hubo reconocimiento de pocas bandas, algunas con pesos moleculares diferentes a los reportados para sueros de caballos infectados experimentalmente (Yépez-Mulia y cols., 1999).

Como ejemplo de lo anterior, podemos referirnos al caballo 152, el cual fue positivo por ELISA y PCR de sangre pero por IET su suero sólo reconoció 2 bandas de 47 y 52 kDa. En base a esto podemos decir que en caballos infectados de manera natural por *T. spiralis*, la IET no es un método confirmatorio de la infección.

Dea-Ayuela y cols. (2001) demostraron que otros nemátodos tienen en sus glicoproteínas el residuo de tivelosa, responsable de la inmunodominancia de los antígenos de superficie y de E/S de la LM de *T. spiralis*, lo anterior pudiera explicar la inespecificidad observada en la IET.

Por otro lado, considerando que 19/54 sueros positivos por ELISA no presentaron por IET reactividad hacia moléculas del parásito (**Tabla 4 y 5**) y por otro el que 21/54 muestras fueran sólo positivos por ELISA, no detectándose la presencia del parásito ya sea

en músculo y/o sangre (**Tabla 6**), puede sugerir la existencia de caballos falsos positivos por ELISA.

Considerando que los resultados obtenidos no muestran una buena correlación entre el ELISA y PCR de diafragma y/o lengua, y que esta técnica molecular permite la amplificación específica de secuencias de ADN del parásito en muestras de diafragma ó lengua y que es a través del consumo de carne de caballo infectado que se transmite la triquinelosis a humanos, el empleo de la PCR de músculo representa una buena alternativa en el diagnóstico de triquinelosis equina. Sin embargo, su uso en rastros de México, resulta difícil debido a su alto costo, por lo que es necesario continuar la búsqueda de un método de diagnóstico de la triquinelosis equina sensible y específico de fácil implementación en los rastros.



## 6. CONCLUSIONES

-Los resultados mostrados en este trabajo demuestran la presencia de *T. spiralis* en nuestro país, por lo que la inspección de carne de caballo para la detección de *T. spiralis* debe realizarse tanto en los rastros TIF como rurales.

-El método parasitológico de Digestión Artificial no permitió la detección de *T. spiralis* en muestras de diafragma ó lengua de caballos del rastro rural y TIF, a pesar de que la cantidad de muestra analizada sea mayor que la recomendada por la Unión Europea.

-Los métodos serológicos del tipo de ELISA e IET no permitieron la detección sensible y específica de caballos infectados con *T. spiralis*.

-Los resultados de ELISA no tienen una correlación directa con la presencia del parásito en los músculos de los caballos infectados.

-El diagnóstico de triquinosis equina mediante la técnica molecular de PCR en músculo de caballo representa una mejor alternativa que los métodos serológicos.

-Existe la necesidad de encontrar métodos de diagnóstico de triquinosis equina que permitan la detección sensible y específica de la infección, además de fácil implementación en los rastros.

## **7.- ANEXO A**

### **AMORTIGUADORES**

#### **Amortiguador de fosfatos salino (PBS)**

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

#### **Amortiguador de carbonatos pH 9.6**

Carbonato de sodio 1.59g y bicarbonato de sodio 2.93g , aforar a 1L

#### **Amortiguador de citrato-fosfato pH 5**

24.3 mL de ac. Cítrico 0.1M más 25.7mL de fosfato de sodio 0.2M ajustar el pH a 5.0 y aforar a 100mL

#### **Amortiguador de corrida**

3.02g de Trisma base, 14.41mL de glicina, 5mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20%, ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1L.

#### **Amortiguador de transferencia**

12.11g de Trisma base, 57.68g de glicina, 800mL de metanol, aforar a 4L.

#### **Solución de incubación para las tiras de nitrocelulosa**

#### **Stock (10x)**

4g de albúmina, 4mL de Tritón x-100 10%, 2mL de SDS al 20%, aforar a 10mL.

## **ELECTROFORESIS DE GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS (SDS-PAGE).**

Para realizar la técnica se prepararon las siguientes soluciones.

### **Amortiguador para el gel concentrador.**

50 mL de Trisma base 2M pH 6.8, 4mL de SDS al 20%, aforar a 200mL.

### **Amoriguador para el gel espaciador.**

187.5ml de Trisma base 2M pH 8.8 y 5mL de SDS al 20%, aforar a 200mL

### **Acrilamida 30% / Bisacrilamida 0.8%.**

60 gr de acrilamida, 1.6gr de N´N´-metilen-bis acrilamida, 60mL de glicerol, aforar a 200mL y posteriormente filtrar varias veces.

### **Amortiguador de muestra.**

Trisma base 2M pH 6.8 (0.78mL), SDS al 20% (2.5mL), glicerol (0.97mL), beta-mercaptoetanol (1.25mL), Pironina al 2% en glicerol al 60% (25uL), aforar a 5mL.

## ANEXO B.

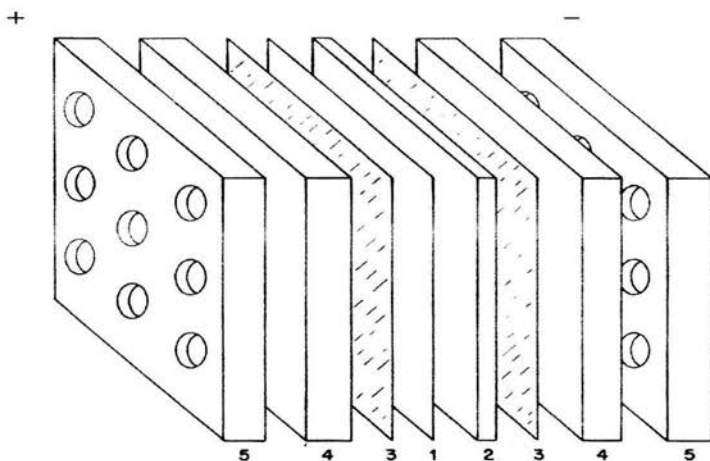
PREPARACIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 10% Y CONCENTRADOR AL 5%.

Para la preparación de los geles de poliacrilamida en presencia de SDS se prepararon las siguientes soluciones.

	GEL ESPACIADOR (10%)	GEL CONCENTRADOR (5%)
BGC (8X)	2.5mL	---
BGE (5X)	---	3.76mL
H2O	8.8mL	14.16mL
Acril-bisacrilamida 30:0.8%	6.32mL	3.32mL
N´N´N´N´-Tetrametilenediamina (TEMED)	12uL	12uL
Persulfato de amonio (APS) 10%	44uL	110uL

La transferencia de proteínas del extracto total de *Trichinella spiralis* separadas por SDS-PAGE empleando geles de poliacrilamida se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1)Papel de nitrocelulosa.
- 2)Gel de poliacrilamida.
- 3)Papel Whatman 3mm.
- 4)Fibras Scotch Brite.
- 5)Soportes de plexiglass.



## ANEXO C

TABLA 7.-RESULTADOS DEL ENSAYO DE ELISA OBTENIDOS CON LOS SUEROS DE CABALLO DEL RASTRO TIF DE AGUASCALIENTES

# SUERO	ELISA D.O. (492nm)	
	ET	ES
1	0.152	0.437
2	0.324	0.358
3	0.282	0.472
4*	0.390	0.487
5	0.262	0.524
6	0.122	0.0
7	0.296	0.366
8	0.176	0.455
9*	0.387	0.503
10	0.191	0.442
11	0.181	0.311
12	0.085	0.226
13	0.162	0.362
14	0.336	0.371
15	0.213	0.347
16	0.116	0.408
17	0.211	0.302
18	0.133	0.437
19	0.197	0.518
20	0.239	0.399
21	0.278	0.719
22	0.100	0.403
23	0.244	0.587
24	0.149	0.472
25	0.238	0.490
26	0.238	0.413
27	0.233	0.495
28	0.094	0.453
29	0.320	0.506
30	0.251	0.575
31	0.298	0.587
32	0.224	0.404
33	0.224	0.369
34	0.197	0.451
35	0.217	0.408

36	0.176	0.311
37	0.175	0.356
38	0.149	0.458
39	0.200	0.233
40	0.223	0.395
41	0.179	0.369
42	0.260	0.514
43	0.282	0.601
44	0.206	0.458
45	0.296	0.537
46	0.196	0.516
47	0.214	0.443
48	0.298	0.665
49	0.141	0.524
50	0.325	0.639
51	0.154	0.366
52	0.137	0.445
53	0.281	0.507
54	0.199	0.403
55	0.249	0.493
56	0.110	0.390
57	0.170	0.338
58	0.233	0.493
59	0.159	0.535
60	0.085	0.222
61	0.078	0.510
62	0.148	0.300
63	0.198	0.406
64	0.242	0.509
65	0.221	0.517
66*	0.516	0.553
67	0.189	0.626
68	0.203	0.381
69	0.195	0.427
70	0.097	0.296
71	0.200	0.357
72	0.234	0.537
73*	0.386	0.489
74	0.217	0.562
75	0.339	0.382
76	0.244	0.294
77	0.209	0.451

78	0.334	0.651
79	0.259	0.570
80	0.284	0.555
81	0.339	0.589
82	0.204	0.536
83	0.054	0.593
84	0.310	0.477
85	0.193	0.588
86*	0.164	0.851
87	0.314	0.611
88	0.197	0.646
89	0.174	0.493
90	0.213	0.488

\* SUEROS POSITIVOS



## ANEXO D

TABLA 8.-RESULTADOS DEL ENSAYO DE ELISA OBTENIDOS CON SUEROS DE CABALLO DE RASTRO RURAL 5 DE JUNIO SAN VICENTE CHICOLOAPAN, EDO DE MÉXICO.

# SUERO	ELISA	D.O.( 492nm)
	EXTRACTO TOTAL	E/S
91	0.169	0.651
92	0.119	0.426
93	0.175	0.561
94*	0.361	0.600
95	0.211	0.455
96*	0.678	0.421
97	0.300	0.543
98	0.277	0.448
99	0.325	0.570
100	0.079	0.603
101*	0.422	0.786
102	0.264	0.343
103	0.170	0.648
104*	0.391	0.504
105*	0.492	0.414
106*	0.412	0.311
107*	0.417	0.186
108	0.221	0.343
109*	0.552	0.530
110	0.169	0.393
111	0.338	0.553
112	0.074	0.597
113	0.171	0.379
114	0.265	0.496
115	0.241	0.483
116	0.186	0.488
117	0.173	0.527
118	0.117	0.260
119	0.198	0.661
120*	0.601	0.434
121	0.272	0.378
122*	0.371	0.359

123	0.172	0.434
124	0.119	0.514
125	0.177	0.417
126*	0.363	0.701
127	0.214	0.399
128*	0.692	0.426
129	0.305	0.518
130	0.283	0.338
131	0.333	0.413
132	0.082	0.352
133*	0.429	0.301
134	0.269	0.390
135	0.172	0.602
136*	0.398	0.400
137*	0.499	0.477
138*	0.416	0.536
139*	0.422	0.457
140	0.229	0.464
141*	0.561	0.250
142	0.172	0.300
143	0.343	0.456
144	0.075	0.509
145	0.174	0.571
146	0.271	0.481
147	0.247	0.355
148	0.189	0.363
149	0.175	0.597
150	0.117	0.474
151	0.201	0.312
152*	0.606	0.227
153	0.277	0.592
154*	0.375	0.328
155	0.282	0.588
156	0.290	0.333
257	0.296	0.485
158	0.287	0.271
159	0.190	0.374
160	0.149	0.570
161	0.307	0.508
162	0.242	0.421

163	0.269	0.261
164	0.140	0.461
165	0.236	0.060
166*	0.663	0.407
167	0.220	0.27
168*	0.772	0.452
169	0.185	0.497
170	0.132	0.483

**\*SUEROS POSITIVOS.**

## 8.- BIBLIOGRAFÍA

-Alvarez-Chacón R., Riega-Camero R.E., García-Rosales J.J., Wong-Chío M., Cob-Sosa C.E. (1992). Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. Biol. Med. Hosp. Infant. Mex. 49 : 286-290.

-Ancelle T., Renaud G., Dupouy-Camet J. and Foulon G. (1990). Evaluation du coût medical et social de deux épidémies de trichinose survenues en France en 1985. Rev. Epidem. Et Santé. 38 :179-186.

-Ancelle T., Dupouy-Camet J., Desenclos J.C., Maillot E., Savage-Houze S., Charlet F., Drucker J. and Moren A. (1998). A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France in 1993. Am J. Trop. Med. Hyg : 615-619.

-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.

-Appleyard G.D., Zarlenga D., Pozio E., Gajadhar A.A. (1999). Differentiation of *trichinella* genotypes by polymerase chain reaction using sequence specific primers. J. Parasitol. 85(3): 556-559.

-Arriaga C, Yépez-Mulia L., Morilla A., Ortega-Pierres G. (1995). Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larva antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. Vet. Parasitol., 58:319-326.

-Arriaga C., Muñoz E., Morilla A., Ortega-Pierres G. (1989). *Trichinella spiralis* : Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp. Parasitol., 69: 363-372.

-Boireau P., Vallée I., Roman T., Perret C., Mingyuan Liu, Gamble H.R., Gajadhar A. (2000) *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. Vet. Parasitol., 93 : 309-320.

-Cabral-Soto J., Villacaña-Fuentes H., Fragoso-Urbe R., Contreras A. (1990). Perfil epidemiológico de la triquinosis en el Estado de Zacatecas. Sal. Pub. Méx., 32 (5): 575-582.

- Contreras A., Herrera E.R. (1992). Trichinosis porcina en el estado de Zacatecas. Rev. Mex. Parasitol., 3 (1): 25-27.
- De la Rosa J.L., Aranda J.G., Padilla E., Correa D. (1998). Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. Int. J. Parasitol., 28: 317-321.
- Dea-Ayuela M.A., Romarís F., Ubeira F.M., Rama-Iñiguez S., Martínez-Fernández A.R. and Bolás F. (2001). Possible presence of common Tyvelose-containing glycans in *Trichinella* T1 L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. Parasite 8 : 120-122.
- Despommier D.D. (1990). *Trichinella spiralis*: The worm that would be virus. Parasitol. Today. 6 : 193-196.
- Despommier D.D., Gold A.M., Buck S.W. (1990). *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. Exp. Parasitol., 71 : 27-38
- Dick T.A., Lu M., de Vos T., Ma K. (1992). The use of the polymerase chain reaction to identify porcine isolates of *Trichinella*. J. Parasitol., 78 (1): 145-148.
- Dupouy-Camet J., (1999). Is human trichinellosis an emerging zoonosis in the European Community ? Helminthologia. 36 : 201-204.
- Dupouy-Camet J., Soule, C., Ancelle T. (1994). Recent news on Trichinellosis: another outbreak due to horse meat consumption in France in 1993. Parasite. 1: 99-103.
- Dupouy-Camet J., Soulé C., Guillou J., Rouer E., Lavareda de Sounza S., Ancelle T., Bénarous R.. (1991). Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. Parasitol. Res., 1991, 77 :180-182.
- Euzéby J. (1994). Une vieille Anthropozoonose toujours actuelle: la trichinose(= trichinellose). Revue Méd. Vét. 145:795-818.

-Gamble H.R., Gajadhar A.A., Solomon M.B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. J. Food Protect., 59: 420-425.

-Garvaki. 1972. Individualisation de *T. pseudospiralis*

-Gerencer M., Marinculic A., Rapic C., Frankovic M. and Valpotic I. (1992). Immunosuppression of *in vivo* and *in vitro* lymphocyte responses in swine induced by *Trichinella spiralis* or excretory-secretory antigens of the parasite. Vet. Parasitol., 44: 263-273.

-Haegherbaert S., Sevat M., Duchen D., Minet J.C. Agrech A.E. Thiése I., Declerc C., Vaillant V. Hemery C., Maillot E., Soule C., Pozio E., Massip P., Mangnaval J.F., Desencios J.C. (1998). Outbreak of trichinellosis in the Midi-Pyrénées region of France January-March 1998. Eurosurveillance, 3(8-9): 83-85.

-Moorhead A., Grunenwald P, Dietz V., Schantz P. (1999). Trichinellosis in the United-States, 1991-1996: Declining but not gone. Am. J. Trop. Med. Hyg . 60(1): 66-69.

-Ortega-Pierres M.G., Arriaga C., Yépez-Mulia L.(2000). Epidemiology of trichinellosis in México, Central and South America. Vet. Parasitol., 93 :201-225

-Parkhouse R.M.E., Philipp M., Ogilvie B.M. (1981). Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. Parasit. Immunol., 3(4): 339-352.

-Polidori G.A., Gramenzi F., Fioretti D.P., Ferri N., Ranucci S., Moretti A., Scacchia M., Belleli C., Baldelli B. (1989). Experimental trichinellosis in the horses. In: trichinellosis: Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on trichinellosis. Edited by Tanner C.E., Martínez-Fernández A.R. and Bolás-Fernández F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press. Madrid, Spain. Pp. 268-274.

-Polidori G.A., Gramenzi F., Moretti A., Ferri N., Fioretti D.P., Scacchia M. Belleli C., N., Ranucci S. and Baldelli B. (1990). Trichinellosi sperimentale nel cavallo: II° esperimento nota I: Aspetti clinici e ricerche parassitologiche. Parassitologia, 32 (S1): 212-213.

-Pozio E. (1998). Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. Parasitol. Today 14 (1): 35-38.

-Pozio E., La Rosa G. (2000). *Trichinella murrelli* n.sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J. Parasitol. 86 (1): 134-139.

-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 muscles from a naturally infected horse. Vet. Parasitol., 74: 19-27.

-Pozio E., La Rosa G., Rossi P., Murrell D. (1992). Biological Characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J. Parasitol., 78 (4): 647-653.

-Pozio E., La Rosa G., Rossi P., Murrell D., Lichtenfels J. F. (1992). Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol., 78 (4): 654-659.

-Pozio E., Paterlini F., Pedarra C., Sacchi L., Bugarini R., Goffredo E., Boni P. (1999). Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. J. Helminthol., 73: 233-237.

-Pozio E., Sacchi D., Boni P., Tamburrini A., Alberici F., Paterlini F. (1998). Human outbreak of trichinellosis associated with the consumption of horsemeat in Italy. Eurosurveillance.3(8-9): 85-86

-Pozio E., Sofronic-Milosavljevic L., Gómez-Morales M.A., Boireau P., Nockler K. (2002). Evaluation of ELISA and Western Blot analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. Vet. Parasitol., 163-178.

-Pozio E., Tamburrini A., La Rosa G. (2001). Horse trichinellosis, an unresolved puzzle. Parasite.2001.(8): 263-265.

-Pozio E., Tamburrini A., Sacchi L., Gomez-Morales M., Corona S., Goffredo E., La Rosa G. (1997). Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. International J. Parasitol., 27:No.12:1613-1621.

-Ramisz A., Balicka A. (1994). Remarks on horse trichinellosis in Poland. Wiadomosci Parazytologiczne 40(4): 381-399.

-Reveles R.G., Villalobos R., Saldivar S., Moreno M.A. (1997). Implante histológico de *T. spiralis* experimental. Parasitol. 21 No 3-4.

-Roberts T., Murrell K.D., Markss. (1994). Economic losses caused by foodborne parasitic disease. Parasitol. Today. 10: 419-423.

-Senutaite J. (1995). Problems of trichinellosis. Acta Zoológica Lituanica Parasitología . 25: 45-51.

-Smith H., Snowdon K.E. (1987). Experimental *Trichinella* infections in ponies. Canadian J. Vet. Res., 51:415-416.

-Sofronic-Milosavljevic L., Pozio E., Patrascu I.V., Skerovic N., Gomez-Morales M.A., Gamble H.R. (2001). Inmunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. Parasite 8 : 260-262.

-Soulé C., Candolfi E., Dupouy-Camet J., Perret C., Collobert C. (1993). *Trichinella spiralis* circulating antigens and antibodies in experimentally infected horses. In: Trichinellosis: Abstract of the 8<sup>th</sup> International Conference on trichinellosis .Orvieto Italy: 141.

-Soulé C., Dupouy-Camet J., Ancelle T., Gillet J.P., Collobert C. (1988). *Trichinella spiralis* larvae in muscle of experimentally infected horses in relation to the antibody response. In: Trichinellosis Proceeding of the 7<sup>th</sup> International Conference on Trichinellosis. Tanner C.E.; Martínez-Fernández A.R. and Bolás-Fernández F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press Madrid Spain.: 275-280.

-Soulé C., Dupouy-Camet J., Georges P., Ancelle T., Gillet J.P., Vaissaire J., Delvigne A., Plateau E. (1989). Experimental Trichinellosis in horses: biological and parasitological evaluation. Vet. Parasitol., 31:19-36.

-Soulé C., Guillou J.P., Dupouy-Camet J., Vallet C., Pozio E. (1993). Differentiation of *Trichinella* isolates by polimerase chain reaction. Parasitol. Res., 79(6): 461-465.



-Soulé C., Guillou J.P., Vallet C. Perret C., Calamel M. (1994). ***Trichinella spiralis*** larvae detected by PCR in the blood of an experimentally infected horse. In: Trichinosis: Proceedings of the 8<sup>th</sup> Int. Conf. on Trichinellosis. Ed. Cambell W.C., Pozio E. and Bruschi F. Instituto Superiore Di Sanita Press Rome, Italy.: 101-104.

-Touratier L. (1991). Prévention et surveillance de la trichinellose. In : Soulé C., Et Dupouy-Camet J. Ed « La Trichinellose Une Zoonose En Évolution », CNEVA-OIE Ed. Paris Francia.Pp. 211-270.

-Uparanukraw P., Morakote N. (1997). Detection of circulating ***Trichinella spiralis*** larvae by polymerase chain reaction. Parasitol. Res., 83: 52-56.

-Viveros N., Arriaga C., García M., Ortega-Pierres M.G., Yépez-Mulia L. (2001). Immunodiagnosis of ***Trichinella*** infection in slaughter horses by artificial digestión, ELISA and PCR. Parasite, 8(2): 257-259.

-Voigt W.P., Noeckler K., Freischem B., Herinksen S.A., Van Knapen F., Martínez-Fernández A., Pfeiffer G., Pozio E., Reuter G., Ring Ch., Soulé C., Weiss H. (1997). Detection of low levels of ***Trichinella spiralis*** in experimetically infected horses. In: Trichinellosis: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Trichinellosis. Ortega-Pierres M.G., Gamble R.,

Van Knapen F. and Wakelin D. Centro de Investigación y Estudios Avanzados IPN. México D.F 629-634.

-Yépez-Mulia L., Arriaga C., Viveros N., Adame A., Benítez E., Ortega-Pierres G. (1999). Detection of ***Trichinella*** infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. Vet. Parasitol., 81: 57-68

-Yépez-Mulia L, Ortega-Pierres M.G. (1994). Actualidades sobre la respuesta inmune hacia ***Trichinella spiralis***. Ciencia y Desarrollo. 117:44-51.

-Yepez-Mulia, L., Ortega-Pierres M.G. (1994). Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la Triquinelosis. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 36:127-138.

## ABREVIATURAS

<b>ABS</b>	<b>albúmina Sérica Bovina</b>
<b>D.O.</b>	<b>densidad óptica</b>
<b>DOC</b>	<b>desoxicolato de sodio</b>
<b>ELISA</b>	<b>ensayo inmunoenzimático en fase sólida</b>
<b>E/S</b>	<b>escreción-Secreción</b>
<b>ET</b>	<b>extracto total</b>
<b>IET</b>	<b>Inmunoelctrotransferencia</b>
<b>LM</b>	<b>larva muscular</b>
<b>LRN</b>	<b>larva recién nacida</b>
<b>PBS</b>	<b>amortiguador de fosfatos salinos</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en Cadena de la Polimerasa</b>
<b>p.i.</b>	<b>post-infección</b>
<b>SDS</b>	<b>dodecilsulfato de sodio</b>
<b>STD</b>	<b>suero de ternera descomplementado</b>
<b>Temed</b>	<b>N´N´N´-Tetrametiletildiamina</b>
<b>TIF</b>	<b>Tipo Inspeccion Federal</b>
<b>TLCK</b>	<b>N-p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona</b>
<b>TPCK</b>	<b>L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona</b>
<b>Tween 20</b>	<b>Polioxietilensorbitan monoclaurato</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Casos reportados de triquinelosis a la Comisión de triquinelosis para América (1995-1997)	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b>	Brotos de triquinelosis informados por la Comisión Internacional de Triquinelosis pa Europa y Asia (ICT, 1999)	<b>11</b>
<b>Tabla 3.</b>	Punto de corte obtenido con sueros de caballos negativos por Digestión artificial e IET	<b>24</b>
<b>Tabla 4.</b>	Resultados de la Inmunolectrotransferencia de los sueros del rastro positivos y negativos por ELISA (Et y/o E/S)	<b>27</b>
<b>Tabla 5.</b>	Resultados de la inmunolectrotransferencia de los sueros del rastro rural positivos y negativos por ELISA (ET y/o E/S)	<b>29</b>
<b>Tabla 6.</b>	Resultados del análisis de muestras de caballos del rastro TIF y del rural positivos para <i>T. spiralis</i> por Digestión Artificial, ELISA y PCR dediafragma ó lengua y sangre	<b>31</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b>	Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i>	<b>6</b>
<b>Fig. 2</b>	Larva muscular dentro de la célula nodriza	<b>7</b>
<b>Fig. 3</b>	Distribución en México donde se han reportado brotes de triquinosis humana ó animal	<b>15</b>
<b>Fig. 4</b>	Resultados de ELISA de los sueros de caballos del rastro TIF empleando ET y E/S	<b>26</b>
<b>Fig. 5</b>	Resultados de ELISA de los sueros de caballos del rastro rural empleando ET y E/S	<b>28</b>