



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Búsqueda de anticuerpos contra *Trichinella spiralis*
en caballos faenados en tres rastros municipales
de los Estados de México, Veracruz y Jalisco**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

David Solís Hernández

ASESOR:

Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana
COASESOR: QFI Antonio Meza Lucas

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTEZ FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Búsqueda de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en caballos faenados en tres rastros municipales de los Estados de México, Veracruz y Jalisco.

Que presenta el pasante David Solís Hernández
Con número de cuenta: 302083646 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Junio de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Gabriela Fuentes Cervantes	
SECRETARIO	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Angel German Martínez Sosa	
2do. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/mmgm*

Este trabajo de tesis se desarrolló en el Laboratorio de Inmunoparasitología, perteneciente a la Coordinación de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, bajo la asesoría del Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana y el QFI Antonio Meza Lucas.

Dedicatoria

Lo plasmado en este trabajo es para alguien que me enseñó mucho con su persistencia y mirada directa en lo que buscaba, ya que se quería comer al mundo. Por darme un choque de realidad, necesario en mi vida aun sin poder compartir tiempo juntos. Muchas gracias, **Luna**.

A mi familia que ha estado en cada etapa de mi vida, siendo de diferentes profesiones, con las cuales he complementado mi desarrollo tomando lo mejor de ustedes para poder esculpir mis propios estímulos que llenan mi vida.

A mi pareja que ha marcado tres grandes momentos de mi vida: la confrontación de los problemas por mi mismo con el trabajo constante a nuevas oportunidades, reforzar **mi** individualidad ante las consecuencias vividas ante mis semejantes con armonía y disfrutar la **vida** con una sonrisa para explorar nuevos horizontes, personas y momentos llenos de adrenalina.

A mis amigos que son un grupo selecto de grandes mentes los cuales me han transmitido sus vivencias y su confianza como colega, ciudadano y persona. Se que pueden contar conmigo como yo de ustedes, culminando este proyecto personal al cual le imprimí un carácter colectivo.

Al lector le deseo dejar huella por el gusto de conocer más sobre Parasitología, Epidemiología e Inmunología, las cuales se entrelazan de manera sorprendente para ver la naturaleza y el equilibrio del hombre.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana por aceptarme en su equipo de trabajo, enseñarme y valorar la importancia de la Epidemiología, la cual tiene un largo camino que recorrer en México, permitiéndome entrelazar el pasado y el presente de la salud del país.

Al QFI Antonio Meza Lucas por confiar en mi trabajo, aun cuando nos topamos con situaciones inesperadas, pero cosechando información útil para las nuevas generaciones ya que como bien lo menciona todo es aprendizaje.

Un especial agradecimiento al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez por permitirme estar en su Coordinación de Investigaciones Inmunológicas, donde se han logrado propuestas en pro del conocimiento y que lo aportado por mi sea otro peldaño más en las líneas de investigación que pueda repercutir en la sociedad mexicana.

A todo el personal de los cuatro laboratorios que conforman la Coordinación (INPA, ACOMO, LINA y LINE) les agradezco sus observaciones, fraternidad ante los momentos que vivimos en la institución, siendo de manera reciproca el intercambio de ideas en mi línea de trabajo y todo el personal del InDRE que se esfuerza día con día por tener una calidad de primer mundo, me motivaron sus palabras de aliento.

Mi mayor elogio a mi Facultad donde aprendí a tener una visión más clara de lo que mi mundo era antes de conocer la UNAM, que me puso retos que logré superar, porque el conocimiento se obtiene con constancia y alternando la manera de cómo se desea aprender.

Le agradezco a los integrantes de mi jurado por tomarse el tiempo de leer mi tesis e indicarme puntos que pulieran este texto para su finalización.

*“Es una lástima porque la incomunicación con los caballos
ha retrasado a la humanidad, dijo Abrenuncio.*

Si alguna vez la rompiéramos podríamos fabricar al centauro”



-Gabriel García Márquez

Índice	Págs.
Abreviaturas y símbolos	iv
Índice de figuras	v
Índice de cuadros	vii
RESUMEN	1
1. Introducción	3
1.1 El parásito	3
1.2 Ciclo biológico	6
1.3 Antígeno de productos de excreción y secreción de la larva muscular	9
1.4 Respuesta inmune contra <i>Trichinella spiralis</i>	14
1.4.1 Respuesta inmune a nivel intestinal	14
1.4.2 Respuesta inmune a nivel muscular	16
1.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por <i>Trichinella spiralis</i>	19
1.6 Inmunobiología del caballo	20
1.7 Cuadro clínico de la triquinelosis	21
1.7.1 Manifestaciones clínicas en el humano	21
1.7.2 Manifestaciones clínicas en animales	24
1.8 Diagnóstico en el laboratorio	25
1.8.1 El diagnóstico directo	25
1.8.2 Diagnóstico indirecto	26
1.9 Tratamiento para la Triquinelosis	29
1.10 Control y Prevención	31
1.11 Situación epidemiológica	35
1.11.1 Presentación en el hombre	35
1.11.1.1 Europa	37
1.11.1.2 América del Norte	40
1.11.1.3 Asia	41
1.11.1.4 Oriente medio	42
1.11.1.5 África	43
1.11.1.6 Oceanía	43
1.11.1.7 América Latina	43
1.11.2 Presentación en animales	48
1.11.2.1 Hospedadores domésticos	48
1.11.2.2 Hospedadores sinantrópicos	57
1.11.2.3 Hospedadores de vida silvestre	58
1.12 Situación actual de la producción cárnica equina	59
2. Justificación	61
3. Objetivo	62
3.1 Objetivos particulares	62
4. Diseño Experimental	63
5. Materiales y métodos	64
5.1 Material Biológico	64
5.1.1 Animales de experimentación	64
5.1.2 Parásito	64
5.1.3 Muestras	64

5.2 Reactivos y equipos por inmunoensayo	64
5.2.1 Propagación de cepa, obtención y conservación de productos de excreción/secreción	64
5.2.2 Cuantificación de productos de excreción/secreción	66
5.2.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	66
5.2.4 Método de inmunoelectrotransferencia o Western blot	67
5.2.5 Técnica de Inmunopunto o Dot-ELISA	68
5.3 Propagación de la cepa de <i>Trichinella spiralis</i>	68
5.4 Obtención de los productos de excreción y secreción en la LM de <i>T. spiralis</i>	71
5.5 Cuantificación y comprobación de integridad de productos de excreción y secreción <i>T. spiralis</i>	73
5.5.1 Cuantificación por método colorimétrico de Bradford	73
5.5.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (SD-PAGE)	74
5.6 Inmunoelectrotransferencia	75
5.7 Inmunopunto o Dot-ELISA	77
5.8 Análisis del estudio diagnóstico	80
5.8.1 Frecuencia de positividad, sensibilidad y especificidad	80
5.8.2 Índice <i>kappa</i>	81
6. RESULTADOS	83
6.1 Obtención de las larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i> y producción de los productos de excreción y secreción	83
6.1.1 Larvas musculares	83
6.1.2 Productos de excreción y secreción	84
6.2 Características de las muestra de suero de caballo	87
6.3 Anticuerpos contra <i>Trichinella</i> en las muestras de suero de equino por inmunoelectrotransferencia	87
6.3.1 Rastro del Estado de México	88
6.3.2 Rastro del Estado de Jalisco	88
6.3.3 Rastro del Estado de Veracruz	88
6.3.4 Muestras positivas	92
6.4 Instrumentación del Dot-ELISA y determinación de anticuerpos contra <i>Trichinella</i> en el suero de caballo	92
6.4.1 Muestras positivas al Dot-ELISA	97
6.5 Utilidad diagnóstica del Dot-ELISA	97
7. DISCUSIÓN	99
7.1 Obtención de larvas musculares y preparación de productos de excreción y secreción	99
7.2 Prevalencia de anticuerpos contra <i>Trichinella</i> por Western Blot	101
7.3 Instrumentación del Dot-ELISA	103
7.2 Utilidad diagnóstico del Dot-ELISA	105
8. CONCLUSIONES	108
9. PERSPECTIVAS	108
10. BIBLIOGRAFÍA	109

Índice de abreviaturas y símbolos

<p>ABZ: Albendazol ADCC: Citotoxicidad celular dependiente a anticuerpos (por sus siglas en inglés) Ag: Antígeno CM: Cepa Mexicana CN: Célula nodriza Conc: Concentración DAB: Diaminobencidina DGE: Dirección General de Epidemiología Dot-ELISA: Ensayo de ELISA en punto o inmunopunto DPI: Días post infección EDTA: ácido etilendiaminotetraacético EEUU: Estados Unidos de América ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés) FCε: Fragmento cristalizante epsilon GalNAc: N-acetilgalactosamina GlcNAc: N-acetilglucosamina GA: Gusano Adulto h: horas H₂O₂: Fórmula del Peróxido de hidrógeno IC: Infiltrado celular ICR: Índice de capacidad reproductiva Ig: Inmunoglobulina InDRE: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica IFNγ: Interferón gamma K: índice kappa kDa: kilo Dalton LM: Larvas(s) Muscular(es) de <i>T. spiralis</i> LRN: Larva(s) Recién Nacida(s) de <i>T. spiralis</i> MBZ: Mebendazol ME: Músculo esquelético MEX: México μg: microgramo mg: miligramo</p>	<p>μL: microlitro mL: mililitro μm: micrómetro mg: milímetro MSUS: <i>Mus musculus</i> género y especie de ratón NC: Nitrocelulosa NK: Natural killer NOM: Norma Oficial Mexicana NOS2: Oxido nítrico sintasa PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés) PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (por sus siglas en inglés) PBS: Solución amortiguadora de fosfato (por sus siglas en inglés) PES: Productos de excreción y secreción antígeno de <i>T. spiralis</i> p.i: Posterior a la infección PMSF: Solución de fenil-metil-sulfonil-fluoruro RPMI 1640: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute RPM: Revoluciones por minuto SSA: Secretaria de Salud TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta TIF: Tipo inspección Federal TLCK: Solución de N-alfa-tosil-lisina-clorometilcetona TsL-1: <i>Trichinella spiralis</i> larva grupo 1 TPCK: Solución de N-tosil-L-fenilalanina-clorometilcetona</p>
--	---

Índice de figuras	Págs.
Figura 1. Morfología de <i>Trichinella spiralis</i> .	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	7
Figura 3. Formación de célula nodriza.	8
Figura 4. Estructura de los diferentes glucósidos presentes en los PES de <i>T. spiralis</i> .	12
Figura 5. Conformación espacial de la tivelosa para interacción con las células.	13
Figura 6. Esquema de respuesta inmune a nivel intestinal contra los gusanos adultos de <i>Trichinella spiralis</i> .	16
Figura 7. Esquema de respuesta inmune a nivel tisular contra las larvas <i>Trichinella spiralis</i> .	18
Figura 8. Distribución del género <i>Trichinella</i> en el mundo.	36
Figura 9. Distribución de casos acumulados, estudios serológicos, reporte en animales (cerdo, caballo, vida silvestre y Hospedadores sinantrópicos: perro, gato y rata) desde 1896 hasta 2016.	46
Figura 10. Número de casos a nivel nacional de la triquinelosis humana (1990-2016).	47
Figura 11. Distribución total de casos de triquinelosis en México 1990-2016.	47
Figura 12. Interacción entre los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre.	50
Figura 13. Esquema de los sitios de preferencia de la LM en músculo del caballo.	53
Figura 14. Producción de los 10 principales productores de carne de caballo a nivel internacional y sus principales consumidores.	60
Figura 15. Diagrama de flujo para la propagación de la cepa.	70
Figura 16. Diagrama de flujo para obtención de productos de excreción y secreción de la LM de <i>Trichinella spiralis</i> .	72
Figura 17. Diagrama de flujo para la cuantificación y electroforesis de PES <i>T. spiralis</i> .	75
Figura 18. Diagrama de flujo para la inmunolectrotransferencia.	77
Figura 19. Diagrama de flujo para la realización del Dot-ELISA.	79
Figura 20. Tabla de contingencia.	81
Figura 21. Tabla de frecuencias y fórmula de kappa.	82
Figura 22. Tabla de concentraciones y absorbancias de la curva patrón.	84
Figura 23. Curva patrón de proteínas mediante el método de Bradford.	85
Figura 24. Resultados de los 4 lotes de PES a partir de una dilución 1:1.	85
Figura 25. Gel de poliacrilamida al 12% con los PES de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	86

Figura 26. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de México contra los productos de excreción y secreción de <i>Trichinella spiralis</i> .	89
Figura 27. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de Jalisco contra los productos de excreción y secreción de <i>Trichinella spiralis</i> .	90
Figura 28. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de Veracruz contra los productos de excreción y secreción de <i>Trichinella spiralis</i> .	91
Figura 29. Relación de resultados en WB por estado.	92
Figura 30. Instrumentación del Dot-ELISA en diferentes modelos de infección experimental (rata, ratón y cerdo).	94
Figura 31. Instrumentación del Dot-ELISA en caballo.	95
Figura 32. Reactividad de los sueros de caballo contra los productos de excreción y secreción de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> por Dot-ELISA.	96
Figura 33. Relación de resultados en Dot-ELISA por estado.	97
Figura 34. Tablas de contingencia para el cálculo de Sensibilidad, Especificidad e Índice kappa.	98
Figura 35. Resultados de sensibilidad y especificidad con la presencia de mancha del Dot-ELISA con respecto a las muestras de WB.	98
Figura 36. Resultados de la concordancia entre la técnica de Dot-ELISA y el estándar de oro (WB).	99

Índice de cuadros	Págs.
Cuadro 1. Familias antigénicas de <i>Trichinella</i> y localización en el parásito.	10
Cuadro 2. Composición glucosídica de diferentes preparados antigénicos de la larva muscular.	10
Cuadro 3. Obtención de células B en especies de mamíferos relevantes para la Inmunología Veterinaria.	20
Cuadro 4. Principales signos y síntomas observados en la triquinelosis.	23
Cuadro 5. Enfermedades humanas que tienen manifestaciones similares a la triquinelosis.	23
Cuadro 6. Otras características de los fármacos más utilizados en la quimioterapia de la triquinelosis.	30
Cuadro 7. Limite de inspección para parásitos en animales faenados.	31
Cuadro 8. Principales instituciones de control zoonosario a nivel nacional e internacional.	34
Cuadro 9. Brotes de triquinelosis por consumo de carne de caballo en Francia e Italia de 1975 a 2005.	40
Cuadro 10. Casos humanos confirmados por hallazgo de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> .	45
Cuadro 11. Número de casos con sospecha clínica de triquinelosis humana en los Estados de México, Jalisco y Veracruz (1990-2016).	48
Cuadro 12. Investigaciones realizadas en cerdos de diversos estados de la República Mexicana para la búsqueda de larvas y seroprevalencia de 1909-2006.	51
Cuadro 13. Frecuencia de caballos infectados por <i>Trichinella spiralis</i> en México mediante técnicas de digestión, serología y biología molecular.	54
Cuadro 14. Frecuencia de positividad en caballos infectados por <i>Trichinella spiralis</i> en diferentes países mediante técnicas de digestión, serología y biología molecular.	55
Cuadro 15. Preparación de la curva patrón para la determinación de proteínas.	73
Cuadro 16. Esquema general de llenado de la curva patrón y muestras.	74
Cuadro 17. Parámetros mínimos para el análisis de un estudio diagnóstico.	80
Cuadro 18. Relación de cada rata infectada por <i>T. spiralis</i> para conocer su capacidad reproductiva.	83
Cuadro 19. Relación de rendimiento por larva con respecto a cada lote y su número de larvas totales.	85
Cuadro 20. Aspecto, color, características y alteraciones de muestras de suero en caballo.	87

Resumen

El objetivo de este trabajo fue la búsqueda de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en caballos faenados en tres rastros municipales de los Estados de México, Veracruz y Jalisco.

Se emplearon 300 muestras de suero de caballo pertenecientes a la colección de sueros del laboratorio de Inmunoparasitología del InDRE. Se analizaron 100 muestras de cada rastro, las cuales fueron obtenidas mediante colecta por oportunidad. La determinación de anticuerpos se realizó mediante inmuno-electrotransferencia o Western blot (WB), utilizando productos de excreción y secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis* como antígeno. Paralelamente se instrumentó un inmunoensayo de inmunopunto o DOT-ELISA con la finalidad de contar con una prueba de diagnóstico rápido. La obtención de los productos de excreción y secreción de la larva muscular se hizo con digestión artificial del músculo esquelético de ratas infectadas experimentalmente con el nematodo *Trichinella spiralis*, liberando a las larvas musculares y conservadas en medio de cultivo para la recuperación de antígeno. La seroprevalencia se determinó por el análisis simple de la frecuencia de positividad en el WB. La evaluación serológica del Dot-ELISA se dio mediante el cálculo del índice *kappa*, tomando como prueba de referencia el WB.

La consideración del resultado positivo a la presencia de anticuerpos contra los PES de *T. spiralis* fue con la visualización del triplete de bandas (55,49 y 45 kDa) en el caso del WB y la presencia de mancha en círculos de nitrocelulosa para el Dot-ELISA, siendo como resultado una frecuencia de positividad del WB de 2% ante el triplete y 5.6% con la presencia de una banda de 45kDa y el Dot-ELISA se obtuvo el 54%. La sensibilidad fue del 50% y la especificidad del 45.9% en la técnica de Dot-ELISA en relación al estándar de oro del WB con la presencia de tres bandas, mientras el 64.7% y 46.2% respectivamente considerando la presencia de 1, 2 ó 3 bandas. Por último la concordancia del

Dot-ELISA ante el WB fue un índice kappa con $\kappa = -0.003$ en relación al WB con triplete de bandas sin tener un grado de acuerdo y $\kappa = 0.022$ considerando el WB con una banda su grado de acuerdo fue insignificante.

Se concluyó que los caballos faenados sí estuvieron en contacto con el parásito debido a la presencia del triplete de bandas en el WB y hubo reactividad en los círculos del Dot-ELISA de cinco muestras que se tomaron en caballos de Veracruz y una muestra en caballos del Estado de México. Se determinó mediante inmunoelectrotransferencia que el 5.6% de los sueros de caballo reaccionaron con los PES de manera inespecífica, reconociendo una banda de 45kDa dando una concordancia entre el Dot-ELISA y la Inmunoelectrotransferencia nula por índice kappa.

El Dot-Elisa solo permite proponerla como una prueba para realizar un tamiz serológico y con dicho resultado evaluar las muestras que presenten una mancha sin reacción de fondo para posteriormente confirmar positividad mediante inmunoelectrotransferencia, considerándose que el diagnóstico de la triquinelosis equina debe usar técnicas que no presenten reacciones cruzadas con otros nematodos y enterobacterias que puedan afectar los resultados y para la instrumentación de nuevas técnicas debe considerarse alternativas para evitar la situación que pueda asociarse con falsos positivos a la calidad del antígeno empleado.

1. Introducción

El nematodo *Trichinella* es el agente causal de la parasitosis denominada triquinelosis; en humanos, dicha parasitosis es un problema de salud pública y causa de pérdidas económicas en la producción animal del cerdo y el caballo. Debido a la importancia zoonótica de la triquinelosis se han tomado medidas de control para la eliminación del parásito en la cadena alimenticia. En Europa se han encontrado casos clínicos relacionados al consumo de carne de caballo y jabalí (Gottstein *et al.*, 2009).

El parásito se transmite por la ingestión de las larvas musculares (LM) que se encuentren encapsuladas en la carne infectada.

1.1 El parásito

El género *Trichinella* lo componen 12 genotipos de los cuales nueve son encapsulados: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murreli*, *Trichinella T6*, *T. nelsoni*, *Trichinella T8*, *Trichinella T9*, *Trichinella 12*; los cuales presentan una cápsula de colágeno donde se encuentra el parásito que se establece en el tejido muscular. Se ha registrado la presencia de tres especies no encapsulados, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* y *T. zimbabwensis* esta última asociada con reptiles y aves mientras el resto mayoritariamente presente en mamíferos (Pozio, 2000).

La clasificación taxonómica de este parásito según Owen (1835) es (Ramírez-Valenzuela, 1981; Correa-Beltrán *et al.*, 2006):

REINO	<i>Animal</i>
SUPERPHYLUM	<i>Achelminthes</i>
PHYLUM	<i>Nematoda</i>
CLASE	<i>Adenoforea</i>
ORDEN	<i>Enoplida</i>
FAMILIA	<i>Trichinellidae</i>
GENERO	<i>Trichinella</i>

Trichinella es un nematodo dioico pequeño y filiforme. El gusano adulto (GA) se caracteriza de la siguiente forma: los machos miden de 1.4 mm a 1.6 mm de longitud por 40 μm de diámetro y presentan dos apéndices caudales lobulados sin espículas copulatrices. Los machos producen espermatozoides no flagelados de dos a tres cromosomas por lo tanto se determina el sexo, sus células somáticas tienen cinco cromosomas (figura 1A). Las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud y producen óvulos con tres cromosomas, posteriormente sigue el útero y después la vulva cerca de la mitad del esticosoma, sus células somáticas tienen seis cromosomas (figura 1B). *Trichinella* es un nematodo ovovivíparo; dentro de útero de la hembra ocurre la eclosión y la primera fase larvaria recibe el nombre de larva recién nacida (LRN; Chávez-Guajardo *et al.*, 2006).

Las LRN miden 120 μm de longitud por 7 μm de diámetro y tienen un conjunto de células, quizás germinales pero no órganos (Pozio *et al.*, 2009). Una vez que la LRN es liberada, migra por el torrente sanguíneo hasta llegar a invadir el músculo esquelético. La LRN representa la fase de invasión al músculo, esta vive en el citoplasma de la célula muscular e induce la agregación de mitocondrias, se produce alargamiento del núcleo con nucléolos prominentes, hipertrofia del glucocálix en cubierta gruesa de colágena formándose una compleja red de vénulas que se cree facilitan el transporte de nutrientes. Esta reorganización del miocito infectado recibe el nombre de célula nodriza y dentro de ella se desarrolla el segundo estado larvario que recibe el nombre de larva muscular (LM; Ribicich *et al.*, 2005).

La LM es la fase infectante y al mismo tiempo la diagnóstica. En la célula nodriza mide 1.2mm y unos 30 a 40 μm de diámetro y está constituida de un cuerpo cuticular, una abertura oral, esófago, anillo nervioso, esticosoma, intestino medio, posterior y cloaca (figura 1C).

El esticosoma está en la parte posterior después del esófago granular, su función es de secreción cuyas células poseen gránulos secretorios altamente antigénicos que descargan a la luz del esófago, comunicación y soporte del esófago (Cruz y Camargo, 2001). Tiene al menos 5 subtipos de gránulos que se diferencian en forma y tamaño el tipo de inclusión, antigenicidad y localización dentro del esticosoma, estos gránulos son alfa 0, alfa 1, alfa 2, beta 2 y gamma (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999).

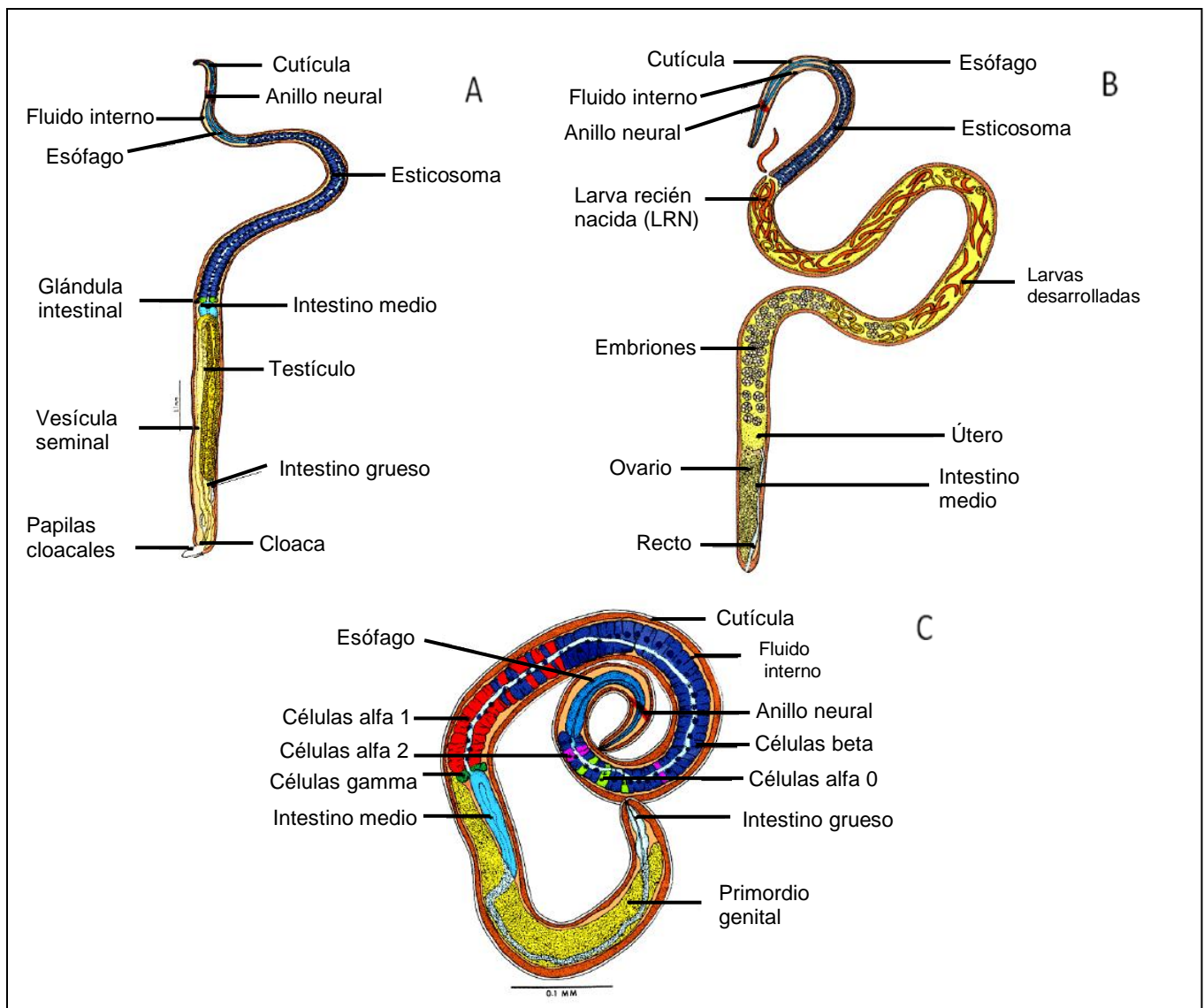


Figura 1. **Morfología de *Trichinella spiralis*.** El esquema representa la morfología de un macho (A), una hembra (B) y una larva Muscular (C). Los esquemas fueron modificados de Vilella J.B. Life cycle and morphology in Trichinosis in Man and Animals S.E. Gould, ed.) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA. Pp.19-60 en www.trichinella.org/biology.htm

1.2 Ciclo biológico

Las fuentes de infección para el humano, el cual es un hospedador accidental son otros hospedadores como el cerdo (donde se lleva el ciclo biológico del parásito regularmente), caballo, jabalí, perro, morsa, zorro y oso. El desarrollo ontogenético del nematodo comprende dos fases, la primera a nivel intestinal o enteral y la segunda en tejido muscular o parenteral (Pozio *et al.*, 2008).

El ciclo de vida de *Trichinella* comienza cuando la larva muscular o forma infectante L1 presente en la carne infestada es liberada en el estómago del hospedador que consumió dicha carne cruda o mal cocida (figura 2); debido a la acción de los jugos gástricos en los miocitos infectados se libera la larva para luego migrar al intestino delgado y al paso de 30 horas pasa por cuatro estadios larvarios hasta convertirse en gusano adulto (GA; de la Rosa y Gómez-Priego, 2008).

El macho penetra los enterocitos del yeyuno para la fecundación de las hembras; este proceso puede durar alrededor de seis o siete días post infección (DPI) para liberar a circulación las LRN que pueden migrar a diferentes órganos pero solo las que lleguen a músculo esquelético sobreviven y crecen. La etapa entérica puede variar entre quince a veinte días antes de ser expulsados, debido a la respuesta inmunológica del individuo y también a su condición genética. Una vez que las LRN migran por el torrente sanguíneo y llegan al músculo esquelético, comienza la etapa parenteral (Murrell y Bruschi, 1994).

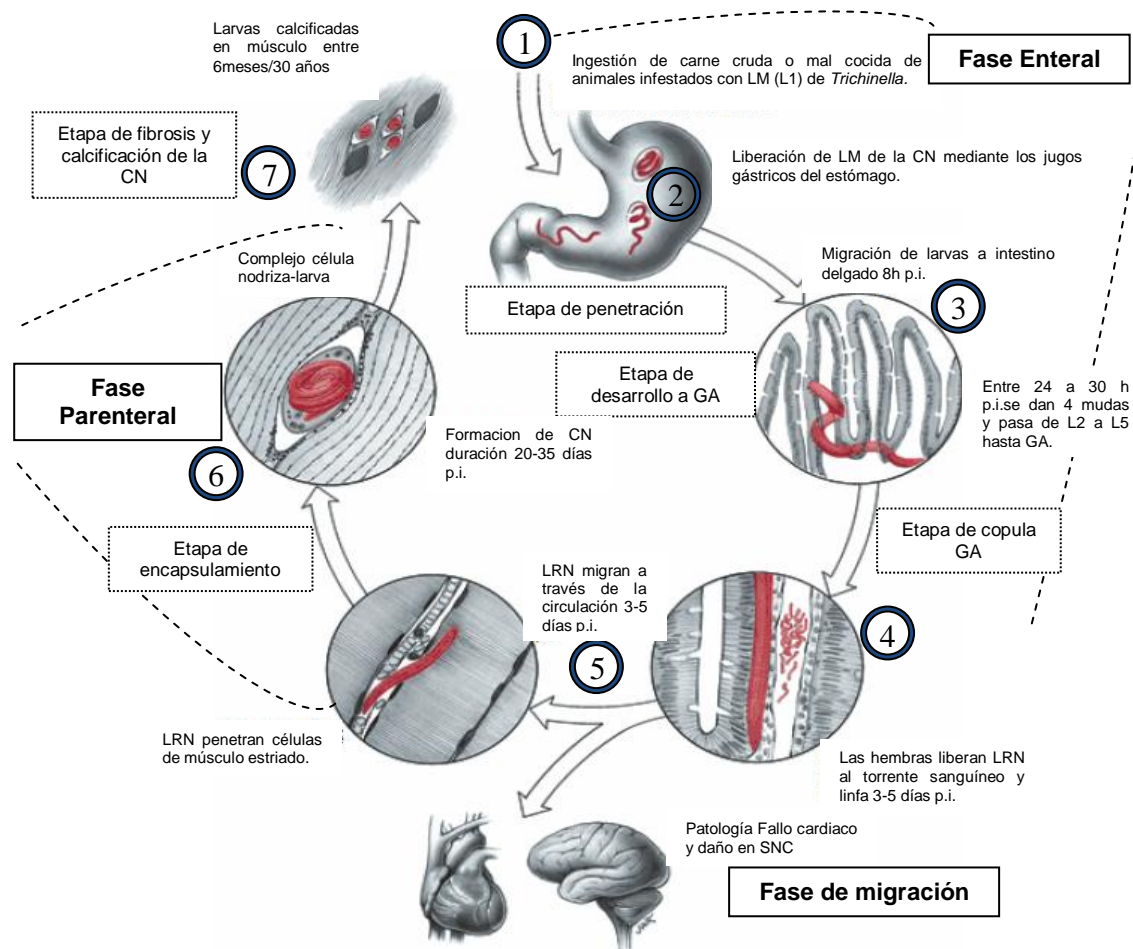


Figura 2. **Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*.** 1 Ingreso de LM en carne infectada. 2 Liberación de larvas a través de los jugos gástricos. 3 Invasión de la mucosa de intestino delgado hasta su desarrollo en adulto. 4 Después de una semana las hembras liberan larvas a circulación. 5 Migración de las LRN por torrente sanguíneo y linfa hasta sitios de músculo estriado. 6 Formación de célula nodriza. 7 Proceso de calcificación de la célula nodriza entre 6 meses a 30 años. Tomado de: Parasitic diseases, 4th Ed. Apple Tress Productions, LLC.

La invasión de la célula muscular puede dividirse en seis etapas principales (figura 3). La célula muscular empieza a perder la organización miofibrilar así como una disolución de sus componentes. Se activan las células satélite las cuales son precursores biogénicos (comprenden el 1% del total del núcleo del miocito situadas entre la membrana plasmática de las células musculares multinucleadas y la lámina basal que rodea cada miofibrila, activándose en respuesta de una lesión muscular; Yin *et al.*, 2013), además de la transformación de la célula infectada con citoplasma basofílico y se delimita con un tabique. Las células satélite proliferan diferenciándose y fusionándose entre si con las

células de músculo infectado, promoviendo un citoplasma eosinofílico. Las células musculares diferenciadas retornan a su ciclo celular pero encerrando a la LM generándose así una hipertrofia del núcleo celular (los mionúcleos no vuelven a su estado original visto en la figura 3 inciso A). Se incrementa el volumen citoplasmático eosinofílico proporcionado por las células satélites mientras que el volumen citoplasmático basofílico de las células musculares disminuye. La larva muscular comienza a enrollarse para completar la formar del complejo larva y célula nodriza (CN). Al madurar la célula nodriza esta contendrá en su totalidad citoplasma eosinofílico (Wu *et al.*, 2008).

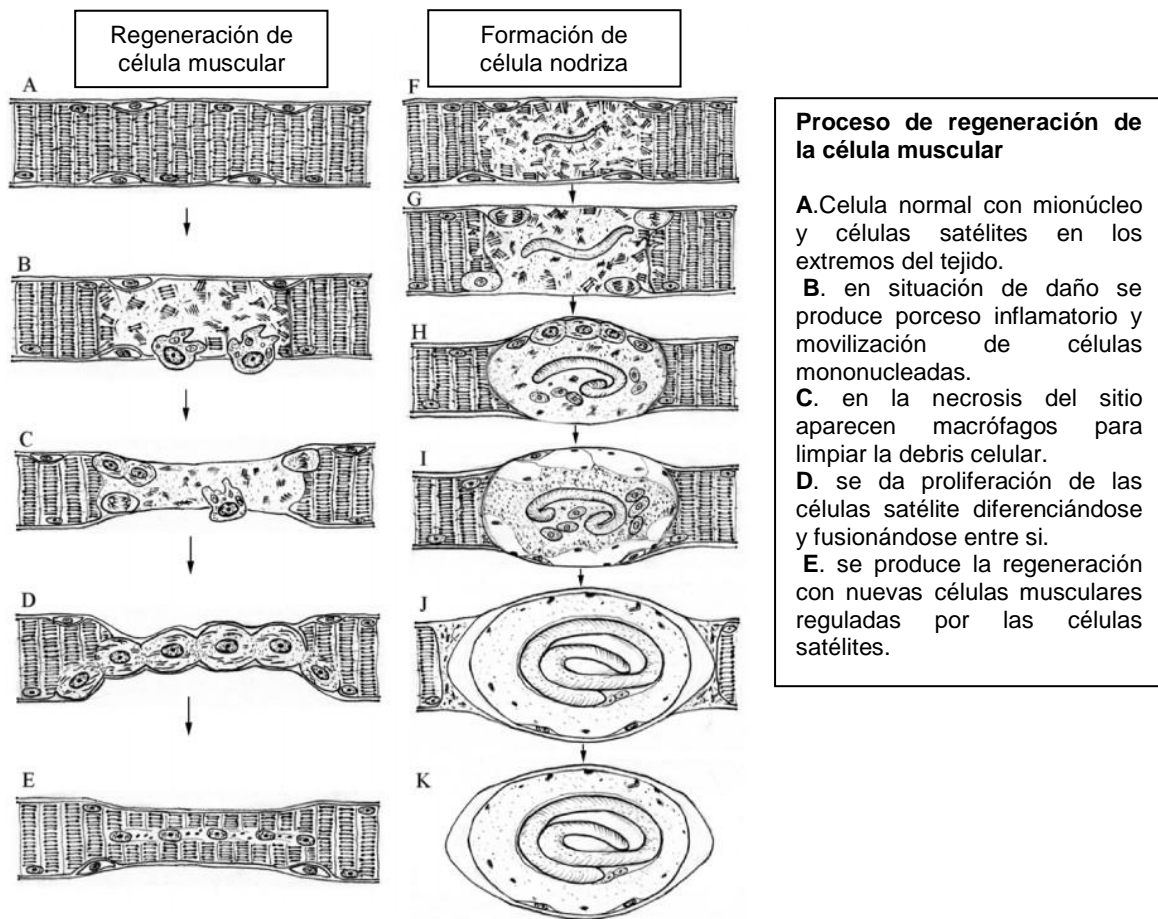


Figura 3. **Formación de célula nodriza.** F Invasión del miocito por LM y disolución de componentes. G Proceso de delimitación de tabique a través de células satélite genera citoplasma basófilo. H Proliferación y fusión de células satélite y genera citoplasma eosinófilo. I Formación total de tabique generándose hipertrofia del núcleo celular. J Formación de complejo larva- célula nodriza. K Maduración de la célula nodriza con citoplasma eosinófilo. Tomado de Wu *et al.*, 2008. Parasites & Vectors. Vol. 27.

1.3 Antígenos de productos de excreción y secreción de la larva muscular

Los antígenos de productos de excreción y secreción (PES) de la LM de *Trichinella* son glicoproteínas. Las glicoproteínas se definen como polímeros formados por aminoácidos y residuos azucarados unidos entre sí covalentemente (Berg *et al.*, 2008). Los PES son producidos en el órgano llamado esticosoma, donde los esticocitos alfa secretan glicoproteínas de 50 a 55 kDa y las de 48 kDa son secretadas por las betas. No se ha aclarado si esta diferencia en la localización dentro del esticosoma se encuentra relacionado con una diferencia estructural entre estos antígenos o refleja la existencia de una proteína precursora común que tenga un proceso post-traducciona, dentro de varias regiones del esticosoma (Zheng *et al.*, 2007).

Los PES se han agrupado en un grupo de antígenos denominado TsL-1 (*Trichinella spiralis* larva) los cuales también agrupan a los antígenos que se encuentran presentes en la superficie de la cutícula de la LM (Ortega-Pierres *et al.*, 1996). Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS por sus siglas en inglés) se llegó a conocer los 12 componentes mínimos que conforman los PES (cuadro 2).

En 1990 se llevó a cabo un taller sobre antígenos de *T. spiralis* en Bithoven (Holanda), que tuvo el objetivo de racionalizar la nomenclatura de los antígenos probados en varios laboratorios con una gran cantidad de anticuerpos monoclonales, sueros policlonales y preparaciones antigénicas utilizando diversos ensayos inmunoquímicos (Appleton *et al.*, 1991). A partir de esos resultados se distinguieron nueve familias antigénicas denominadas TsL-1, TsL-2, TsL-3, TsL-4, TsL-5, TsL-6, TsL-7, TsL-8 y TsA (Ortega-Pierres *et al.*, 1996), los PES se encuentran clasificados en la familia TsL-1 (cuadro 1). Por otra parte se realizó otra caracterización de los grupos antigénicos en donde las ocho fracciones conocidas (TsL1-TsL8) en extracto crudo de la larva muscular junto con el empleo de otros anticuerpos monoclonales dirigidos a los genotipos T5 (*T. murelli*), T1 (*T. spiralis*) y T3 (*T. britovi*) con la finalidad de ampliar el estudio a

otros fenotipos estableciéndose once grupos antigénicos de acuerdo a su patrón de inmunofluorescencia indirecta en secciones transversales del nematodo. Los anticuerpos monoclonales contra los antígenos solubles de *T. spiralis* fueron reconocidos principalmente en los epítomos de los esticocitos y en la superficie de la cutícula mientras los anticuerpos seleccionados a los otros genotipos fortalecieron la relación entre las dos especies como herramienta con fines en la genética del género *Trichinella* (Boireau *et al.*, 1997).

Cuadro 1. Familias antigénicas de *Trichinella* y localización en el parásito.

Grupos antigénicos	Reconocimiento por AcMo	PM (kDa) por SDS-PAGE		Localización
		Reductoras	No reductoras	
TSL-1	Tsp130 7C2C5 NIM-M1 9D4 9E6 18H Mab1 E10	45 y 50	45-100	Presentes en excreciones y superficie del parásito (los AcMo reconocen los antígenos de superficie de 105, 97,55 y 51 kDa). Parecen específicas de estadio, eliminándose durante las mudas a las 24h. de entrada del parásito. Se origina en esticosoma y son los mayoritarios.
TSL-2	305	45-50	Una única banda de 45kDa	Secreciones y superficie de L1 (solo 105 y 51kDa).
TSL-3	16H	No reacciona	45	Superficie de L1 (95 y 51 kDa). Dudosa en excreciones
TSL-4	Mab 2 Ts2 US2 (sin PC)	45	35 y 45	Superficie de la larva (105, 97,55 y 51 kDa). No aparecen en excreciones. Están presentes también en extractos de adultos y embriones. Portan el epitopo fosforilcolina.
TSL-5	6D8	30-36	Doblete de 36	Secreciones de L1. No están en la superficie de larva.
TSL-6	Mab 5	Sin datos	17	Por algunos autores este monoclonal reacciona con antígenos del grupo TSL-1.
TSL-7	6B1	32 y 45 A veces como solo la de 45	32 y 45	No aparece en secreciones ni en superficie del parásito.
TSL-8	Mab 6	40 y 45	43	No aparece en secreciones ni en superficie. No son específicos de L1. Aparecen en extractos de adultos pero no en embriones. Portan el epitopo fosforilcolina
TSA-1	10E8	40	Sin datos	Excreciones de adulto. Específicos de este estadio.

Adaptado de Ortega-Pierres *et al.* (1996).

Cuadro 2. Composición glucosídica de diferentes preparados antigénicos de la larva muscular.

Componente de residuo glicosidado	TsL-1 en % mol	Excreción Secreción en % mol	Homogenizado en % mol
Tivelosa	24	21	8
Fucosa	36	19	12
Xilosa	0	1	1
Manosa	22	17	19
Galactosa	0,5	2	2
Glucosa	1	4	19
GalNAc	9	15	13
GlcNAc	7	21	25
Mio-inositol	0,5	0	1
Ácido siálico	0	0	0

Adaptado de Wisnewski *et al.* (1993).

Las proteínas funcionales que se llegan apreciar en los PES de *T. spiralis* son proteínas de choque térmico, endonucleasas, serin proteasas, endonucleasas, proteínas de unión a DNA e inhibidores de serin proteinasas las cuales se van presentando a lo largo del desarrollo del parásito además de inducirse una respuesta en la fase enteral a nivel intestinal aproximadamente a las dos semanas post infección, mientras que los antígenos TsL-1 al estar presente en la LM a las cuatro o cinco semanas post infección dentro del tejido muscular y ser parte de los PES que secreta en la invasión al epitelio intestinal. Se ha demostrado que la mayoría de los anticuerpos anti-tavelosa pueden reconocer el grupo de glicoproteínas TsL-1 entre 40 a 70 kDa de la LM mientras los PES a condiciones reductoras reconocen de 45 a 55 kDa (McVay *et al.*, 1998; Nagano *et al.*, 2004).

Los antígenos TsL-1 de manera estructural presentan una unión N con tres y cuatro antenas con residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unido en β a N-acetilglucosamina (GlcNAc; Reason *et al.*, 1994) todos los residuos de las antenas están cubiertos con grandes cantidades del azúcar 3,6-dideoxy-D-arabinohexosa (CDPTavelosa; Wisnewski *et al.*, 1993; Morelle *et al.*, 2000), todo esto debido a que pueden enlazarse al átomo de nitrógeno amídico de la cadena lateral de la asparagina y todos los oligosacáridos N –enlazados tienen en común un pentasacárido nuclear o central formado por 3 manosas y dos N-acetilglucosaminas que junto con la fucosa y el ácido siálico se denominan monosacáridos modificados (figura 4; Berg *et al.*, 2008).

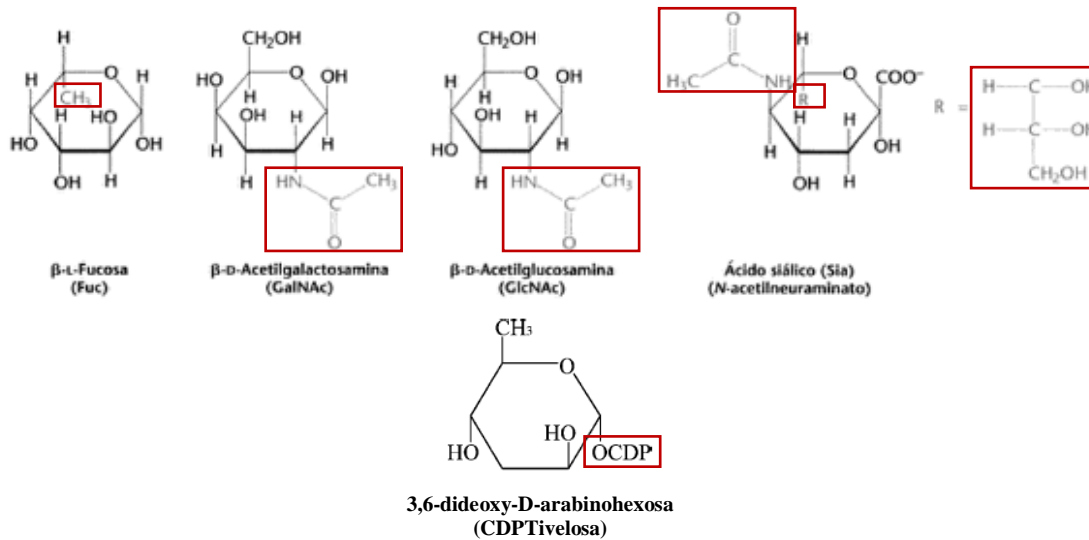


Figura 4. Estructura de los diferentes glucósidos presentes en los PES de *T. spiralis*. Monosacáridos modificados mediante la adición de un sustituyente (representados en rojo) distinto de los grupo hidroxilo, los cuatro primeros (Fuc, GalNAc, GlcNAc y Sia) pueden encontrarse en superficies celulares y el quinto (D-tivelosa) es exclusivo del género *Trichinella*. Adaptado de Berg *et al.*, 2008. Bioquímica 6ª Edición.

La importancia del residuo de tivelosa es ser específico del género *Trichinella* aunque se ha reportado la presencia de tivelosa en ciertos lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Salmonella* además en huevos de *Ascaris*. El enlace en los antígenos TsL-1 es β mientras que en las bacterias es α y su estructura esta con dirección D-tivelosa mientras la presente en los huevos de *Ascaris* es L-tivelosa (Ellis *et al.*, 1997).

Las glicoproteínas con D-tivelosa de los PES presentan dos grupos glucano en el aminoácido N-terminal y el peso del polipéptidos deglicosilados se encuentra entre los 32 y 33 kDa, además de contener cisteína y presentar carbohidrato próximo al extremo N terminal (Kennedy y Harnett, 2001).

Otra característica importante en la composición de carbohidratos de los antígenos PES y los antígenos TsL-1 es la elevada concentración de fucosa y tivelosa localizadas en el extremo reductor de las cadenas oligosacáridas y su naturaleza hidrofóbica son características de una alta inmunogenicidad ya que

tanto anticuerpos monoclonales como sueros policlonales dirigidos contra carbohidratos lo harán frente a los monosacáridos o los disacáridos terminales no reductores (Denkers *et al.*, 1991; Bolas-Fernández y del Corral-Bezara, 2006). Cabe señalar que la glicoproteína de 45 kDa es el epítipo predominante reconocido en los hospedadores infectados por *Trichinella* (Bruschi *et al.*, 2005).

Sin embargo, por estudios de biología molecular se ha encontrado que a pesar de ser glicoproteínas, difieren en la secuencia de aminoácidos N-terminal, composición aminoacídica y coeficiente de extinción (parámetro de absorción de luz a una longitud de onda ya sea por su unidad de masa o concentración molar; Bradford, 1976) siendo aquellas con la presencia de una estructura subterminal de GalNAc con los residuos N- de GlcNAc los cuales pueden presentar ramificaciones o antenas a los N-glicanos influyendo en la actividad enzimática (Figura 5; Yepez-Mulia *et al.*, 2007).

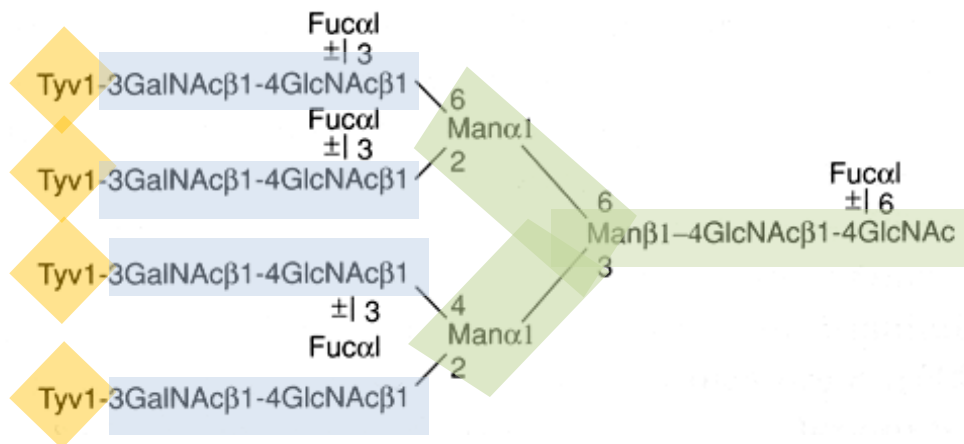


Figura 5. **Conformación espacial de la tivelosa para interacción con las células.** Se presenta el oligosacárido N- enlazado conformado del núcleo pentasacárido (sombreado en verde), presencia de las antenas con los residuos de GlcNAc y GalNAc en posición β (sombreado en azul), la unión terminal de tivelosa (sombreado en naranja con GalNAc y la fucosa (sin sombreado) con GlcNA. Adaptado de Berg *et al.*, 2008. Bioquímica 6ª Edición.

1.4 Respuesta inmune contra *Trichinella spiralis*

Esta comprendida en dos sitios uno a nivel intestinal y otro a nivel muscular. La respuesta a nivel intestinal implica la expulsión de los GA, generándose un cuadro diarreico inducido por la producción de moco y peristaltismo del intestino mediado por degranulación de células cebadas y basófilos, por otra parte para abatir el número de LRN que migran hacia torrente sanguíneo en donde la respuesta protectora esta mediada por las células T con fenotipo CD4+, las cuales se generan en los primeros días de la infección en la mucosa intestinal y posteriormente migran a los nódulos mesentéricos y a las placas de Peyer, donde se genera la respuesta inflamatoria o bien la respuesta mediada por anticuerpos (Bruschi *et al*, 2008).

1.4.1 Respuesta inmune a nivel intestinal

Primero se regula mediante una respuesta Th2(figura 6) que es estimulada por los antígenos del parásito en los linfocito Th2 que secretan citocinas, siendo las interleucinas (IL) 4, 5, 9 y 13 las principales moléculas secretadas; la IL-4 actúa sobre los linfocitos B para la producción de los isotipos IgA, IgG, IgM e IgE, se le asocia con la hiperplasia (proceso que puede asociarse la mutación del su receptor de superficie tirosina-kinasa)de las células cebadas o mastocitos en el intestino y además induce en los linfocitos B la producción de IgE específica estimulando su atracción al intestino (Ramaswamy *et al.*,1994;Grencis *et al.*, 1991; Morfin y Castillo, 2009); la IL-5 atrae gran cantidad de eosinófilos a la ubicación del parásito, los cuales liberan gránulos que son más tóxicos para los helmintos y la IL-13 en conjunto con IL-4 son requeridas para la activar la transcripción de Stat6 (Stat6 activa el factor de transcripción GATA-3 el cual puede tener una autoactivación creando una retroalimentación que estabiliza el compromiso del perfil Th2, además de GATA-3 se ha demostrado que la presencia de los factores de transcripción Maf (c-maf) y el factor nuclear de células T activadas, citoplasma 1(NFATc1 por sus siglas en inglés) regulan la producción de la IL-4) que influye en la expulsión de los GA y en la producción

de hiperplasia de los mastocitos (debido principalmente a la promoción de un proceso de inflamación alérgica sostenida; Romagnani, 2000) para regular la producción de las citocinas, además la liberación de la quimasa en la mucosa mediante los mastocitos en conjunto con las células caliciformes estimuladas bajo la acción de IL-4 e IL-13 que promueve la hipersecreción de moco contribuyen en la permeabilidad del intestino facilitando el paso de los anticuerpos al lumen intestinal que culmina en una respuesta inflamatoria la cual se vuelve un hábitat hostil para el parásito para ser expulsado (Knight *et al.*, 2000; Ouyang *et al.*, 2000; McDermonntt *et al.*, 2003). Las IgE circulantes por el lumen intestinal opsonizan al parásito y los eosinófilos reclutados mediante la IL-5 se unen a esta inmunoglobulina a través de sus receptores para el fragmento cristalizante épsilon ($FC\epsilon$), mientras que los macrófagos activados alternativamente mediante la presencia de IL-4 e IL-5 intentan fagocitar al GA opsonizado sin éxito, por otro lado la unión de los antígenos de Excreción/Secreción con la IgE unido a mastocitos y basófilos así como la presencia de IL-9 desencadena su degranulación para la liberación de agentes vasoactivos estimulan las células caliciformes para incrementar la mucosidad e inducir el peristaltismo de la mucosa intestinal, finalizando con la expulsión de los GA, aparte de esta acción se libera el factor de necrosis tumoral ($TNF-\alpha$) el cual permite la activación de los macrófagos de manera clásica para la producción de óxido nítrico mediante la óxido nítrico sintasa (NOS2) en la L-arginina siendo útil para la defensa contra el parásito con la desventaja de desarrollar una enteropatía dado la perpetuidad del proceso inflamatorio (Negrão-Corrêa, 2001; Helmbly y Grecis, 2002).

La interacción de los mastocitos con antígenos TsL-1 puede inducir la degranulación de estos pero hace que no se exprese Interferon gamma ($IFN\gamma$), el cual es importante para la actividad del perfil Th1 sumado a que los niveles de $IFN\gamma$ se ven afectados mediante GATA-3 en los linfocitos Th2 el cual promueve mayor concentración de IL-4 e IL-5 mientras disminuye $IFN\gamma$ (Zheng y Flavell, 1997).

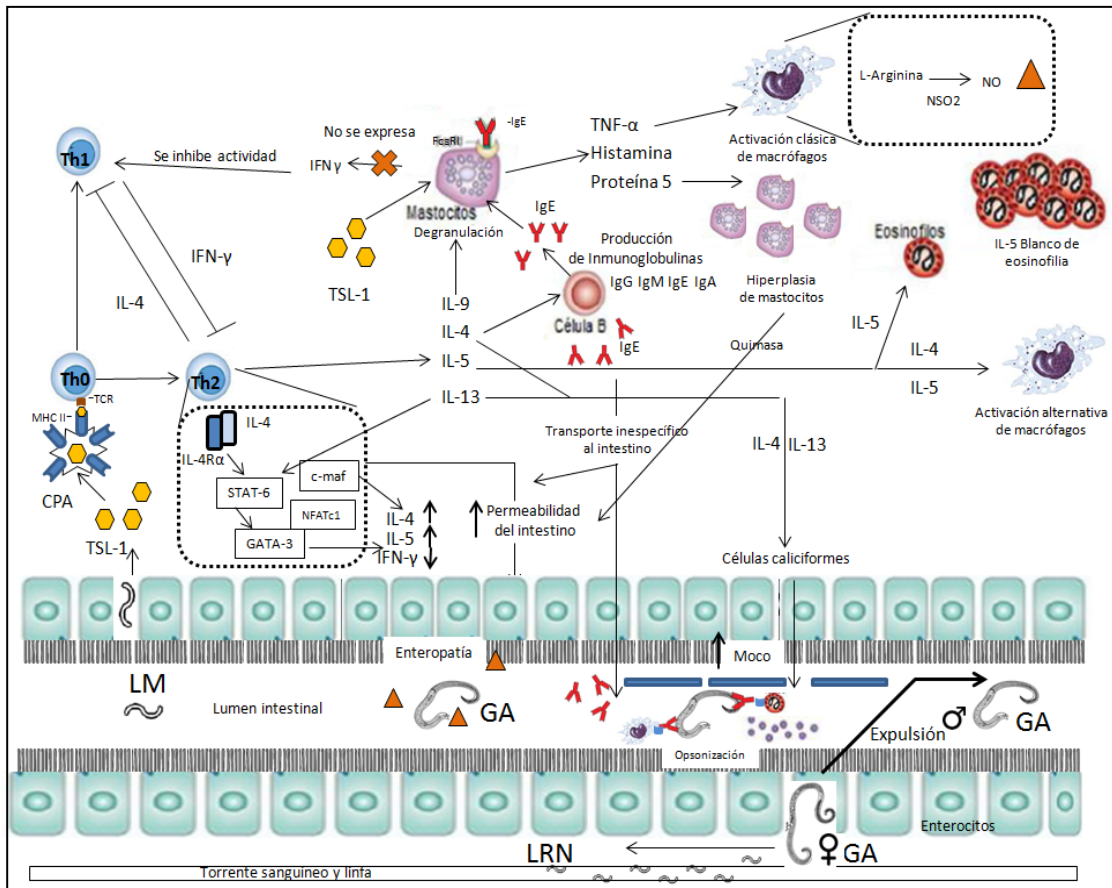


Figura 6. **Esquema de respuesta inmune a nivel intestinal contra los gusanos adultos de *Trichinella spiralis*.** La expulsión del GA se ve regulada por una respuesta tipo Th2 que induce la hipercontractibilidad de la mucosa intestinal, reclutamiento de eosinófilos, macrófagos y mastocitos los cuales desgranulan radicales libres y enzimas proteolíticas; además es abundante la actividad de las inmunoglobulinas específicas (IgE) para opsonizar al parásito y actúen tanto macrófagos en fagocitosis y eosinófilos desgranulándose y promover la expulsión del gusano. Este proceso no evita que las LRN pasen a circulación. Adaptado de la Rosa J. (2012).

1.4.2 Respuesta inmune a nivel muscular

La respuesta inmune en músculo no está completamente comprendida y ocurre durante su invasión (figura 7), cuando la LRN pasa a circulación llegando por vía porta a los ganglios linfáticos donde las células cebadas constituyen otro mecanismo inespecífico de eliminación aumentando considerablemente su población contra el parásito pero la eliminación de este estadio puede suceder por las células fagocíticas (macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) que se adhieren a la superficie de la LRN y forman vacuolas liberando mediadores de superficie

anti-LRN provocando su eliminación mediante la perforación de su cutícula (Venturiello *et al.*, 2000). Si la larva logra penetrar el miocito se ven alterados parámetros biológicos (enzimas musculares, eosinofilia y leucocitosis) dada la instalación del parásito que induce una fuerte respuesta inflamatoria donde se sabe que la expresión de la glicoproteína de 45 KDa esta presente en el músculo esquelético del hospedero para la formación de la CN, se genera una miositis típica en los pacientes durante la fase parenteral de la infección (Li y Ko,2001; Pozio *et al.*,1993; Maldonado-Tapia *et al.*, 2007; Vassilatis *et al.*,1996), dicha inflamación se regula mediante la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) alrededor de la célula nodriza donde reside el parásito mientras los linfocitos B manejan una potente y persistente respuesta durante la infección muscular incrementando los niveles de IgG1 e IgE en la tercera-cuarta semana de infección(Fabre *et al.*, 2009). En modelos *in vitro* los anticuerpos son capaces de eliminar a las LRN por una acción de citotoxicidad celular dependiente a anticuerpos (ADCC por sus siglas en inglés) donde intervienen neutrófilos y eosinófilos al igual que las células NK (Natural Killer por sus siglas en inglés) pero no *in vivo* debido a que la larva ha penetrado el miocito (Venturiello *et al.*, 1995; de la Rosa, 2012).

Se ha observado que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC por sus siglas en inglés) constituidas en su mayoría por linfocitos y monocitos expresan IL-2, IL-5, IL-10 e IFN γ con presencia de fenotipo CD8+.La presencia de IL-5 mediante los linfocitos CD4+ de perfil Th2, se genera un sinergismo junto con la quimiocina Eotaxina 1 (CCL11) para atraer eosinófilos a través de su receptor CCR3 ya que este regula la quimiotaxis y la adhesión de los eosinófilos ya sea cuando se reclutan en la mucosa del yeyuno alrededor del parásito o bien en el músculo esquelético alrededor de la célula nodriza (Gómez-Morales *et al.*,2002; Dixon *et al.*, 2006; Gurish *et al.*,2002).

El infiltrado que rodea a la célula nodriza individual tiene varias células efectoras, entre ellas eosinófilos, basófilos, células cebadas, macrófagos, gran número de CD4+ T , pocos CD8+ T y linfocitos B (Caraballo y Zakzuc, 2012). En un estudio

realizado por de la Rosa *et al.*, (2012) se determinó la presencia tanto de eosinófilos, mastocitos, linfocitos CD4+, CD8+, células NK, Linfocitos B y macrófagos rodeando a la LM.

Por último durante la respuesta del hospedador se ha sugerido que el parásito puede inducir estrés oxidativo dado que tiene enzimas antioxidantes (reductasa, deshidroascorbato y hemoxigenasa I) para evitar la presencia de radicales como hidroxilo, óxido nítrico y peróxido de hidrógeno debido a que son un poderoso mecanismo efector contra los parásitos (Nanev *et al.*, 2011; Hadas *et al.*, 1994).

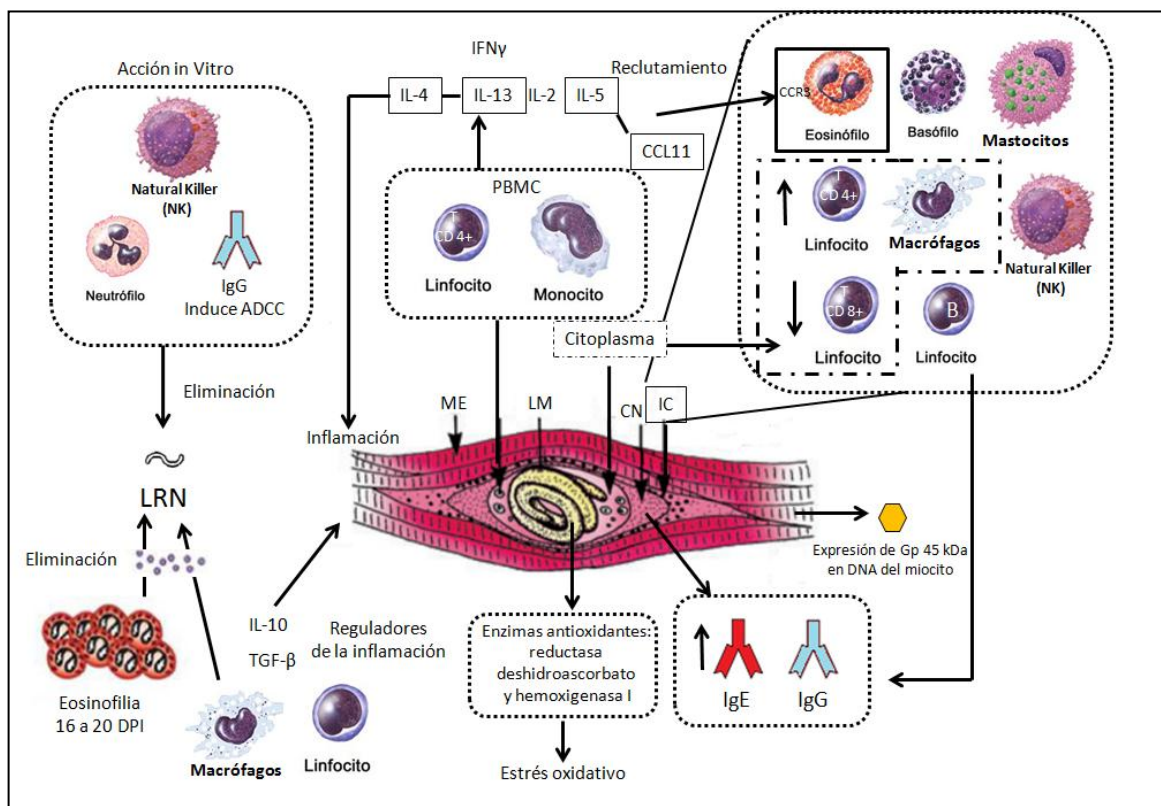


Figura 7. **Esquema de respuesta inmune a nivel tisular contra las larvas *Trichinella spiralis*.** LRN (larva recién nacida): Eliminación de estas en circulación por perforación de cutícula mediante mediadores de superficie (eosinófilos, macrófagos, neutrófilos) mediante estímulo *in vitro* por inducción de ADCC de los anticuerpos IgG a neutrófilos y células NK. **ME** (Músculo esquelético): Sufre proceso de inflamación inducido por IL-4 e IL-13 y regulado por IL-10 y TGF- β liberados por macrófagos y linfocitos, además se expresa la gp de 45kDa en su DNA. **LM** (Larva muscular): deforma la estructura del miocito para desarrollar la célula nodriza mientras se agrupan PBMC para una respuesta Th2 donde se reclutan eosinófilos mediante su receptor CCR3 mediante la acción sinérgica de CCL11 e IL-5, además libera enzimas antioxidantes contra los radicales libres de oxígeno provocando estrés oxidativo. **CN** (Célula nodriza): Estructura con colágeno que funciona como barrera ante las células del sistema inmune del hospedador, se presentan gran cantidad de anticuerpos IgG e IgE. **Citoplasma**: Contenido de la CN se pueden encontrar macrófagos, gran cantidad de CD4+T y poco CD8+ T. **IC** (Infiltrado celular): Acumulación de células efectoras alrededor de la CN que no le generan daño pero si al resto del tejido muscular por la liberación de su contenido. Adaptado de la Rosa J. (2012).

1.5 Mecanismos de evasión de la respuesta inmune por *Trichinella spiralis*

Los mecanismos de evasión de la respuesta inmune están comprendidos en dos clases, (I) antígeno-dependiente, reclusión anatómica, antígeno estado-específico, liberación de antígenos y mimetismo molecular y (II) modulación de la respuesta inmune del hospedador, los más relevantes son los que se refieren a la dependencia de antígeno ya sea a la reclusión anatómica y a los antígenos que son estados específicos, el primero relacionado a las LM *T. spiralis* encapsuladas en las fibras musculares que puede liberar antígenos para que el sistema inmune tenga una acción hacia ellos pudiendo evadir una confrontación directa pero en el caso de las especies no encapsuladas tienen como estrategia la interferencia inmuno-endocrina (Bruschi, 2002).

La relación antígenos estado–específico está como una respuesta por parte de los anticuerpos contra el estado adulto pero no reconoce a la LRN; los anticuerpos específicos para los antígenos de superficie de las LRN de *T. spiralis* no aparecen hasta la cuarta semana de infección, cuando el parásito está en la célula nodriza y no puede ser atacado, incluso dentro de las primeras horas de vida de la LRN tiene modificaciones en las proteínas de superficie que evaden la acción de las células efectoras, lo cual se ha demostrado en ratones y en seres humanos (Arizmendi *et al.*, 2007).

La modulación del sistema inmune puede ser ejercida a nivel central (sistema regulatorio) o a nivel periférico (sistema efector) por lo cual el parásito podría modular la respuesta del hospedador a través de la activación policlonal de linfocitos y eosinófilos además de inducir inmunosupresión. La activación policlonal de los linfocitos es la responsable del incremento en los niveles de IgG, IgM e IgE, esta última con cantidad que se produce en exceso pero siendo inespecífica que compite con la IgE específica por los receptores de afinidad del tipo Fc γ RI encontrados en las células cebadas y basófilos previniendo su activación (Barriga, 2006).

Los mecanismos de escape de *Trichinella* incluyen el bloqueo de las funciones efectoras de los leucocitos, la acumulación de complejos inmunes, inducción de anticuerpos de bloqueo y la inhibición del complemento (Saenz *et al.*, 2010).

La actividad de la glicoproteína de 45 kDa suprime la respuesta quimiotáctica de los neutrófilos impidiendo su flujo hacia el músculo donde se estableció la LM, contribuyendo no solo a la reducción de la miositis, sino también a la prevención de la destrucción del parásito esto debido a que su reclutamiento es dependiente de IFN γ que se mencionó en la expresión en las células cebadas (Bruschi, 2004; Shupe y Stewart, 1991).

1.6 Inmunobiología del caballo

Se ha estudiado los anticuerpos del caballo y se sabe que hay siete subclases de anticuerpos IgG (cuadro 3) de las cuales hay tres principales denominadas IgGa, IgGb e IgGc, mientras de manera no tan reconocida esta la IgGT también denominada IgT (Helms y Allen, 1970), la cual se ha asociado a la respuesta contra parásitos y al toxoide tetánico del cual debe su nombre aunque no es claro su mecanismo ante los parásitos (Gorman y Halliwell, 1989).

Cuadro 3. Obtención de Células B en especies de mamíferos relevantes para la Inmunología Veterinaria.

	Ratón	Oveja	Cerdo	Vaca	Perro	Gato	Caballo	
Inmunoglobulinas de cadena pesada	IgG1-4, IgM, IgA, IgE, IgD	IgG1-3, IgM, IgA, IgE, IgD	IgG1-4, IgM, IgA, IgE, IgD	IgG1-3, IgM, IgA, IgE, IgD	IgG1-4, IgM, IgA, IgE1, IgE2, IgD	IgG1-3, IgM, IgA1, IgA2, IgE1, IgE2	IgG1-7, IgM, IgA, IgE, IgD	
Unidades de inmunoglobulinas de cadena ligera	$\kappa > \lambda$	$\lambda > \kappa$	$\kappa = \lambda$	$\lambda > \kappa$	$\lambda > \kappa$	$\lambda > \kappa$	$\lambda > \kappa$	
Tejido linfoides primario	Hígado fetal/medula ósea	Hígado fetal/IPP	Medula ósea	Medula ósea/IPP	Medula ósea/IPP	Medula ósea	Medula ósea/IPP	
Diversificación de anticuerpos	Comb > Junct > SHM >> GC	SHM > Junct > GC > Comb	Junct > SHM > Comb	SHM > Junct > GC > Comb	SHM > Comb	Comb > SHM	SHM > Junct > Comb	
Transferencia de la madre al feto	IgG	No	No	No	Pocas IgG	Pocas IgG	No	
Transferencia externa por la madre	Calostro leche	IgG>>IgM>IgA IgG>IgA>IgM	IgG>>IgM>IgA IgG>IgA>IgM	IgG>>IgA>IgM IgA>IgG>IgM	IgG>>IgM>IgA IgG>IgA>IgM	IgA>IgG>IgM IgA>IgM>IgG	IgG>>IgA>IgM IgA>IgG>IgM	IgG>IgA>IgM IgA>IgG>IgM
Inmunoglobulinas a nivel de mucosa	IgA	IgA	IgA	IgA	IgA	IgA	IgA	
Células B fagocíticas	Sí	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

Siglas en inglés: Comb (Diversidad combiantoria), GC (Conversión de genes), IPP (Placas de Peyer del Ileon), Junct (Diversidad de unión), SHM (hipermutación somática) y ND (No determinado). Tomado y modificado de Parra *et al.* (2013).

La regulación de este anticuerpo está ligada a la respuesta de los linfocitos con las diferentes interleucinas, lo que le caracteriza con respecto de otras inmunoglobulinas es no activar al complemento ni tener la capacidad de aglutinar pero si de neutralizar la toxina tetánica, este mecanismo le confiere la capacidad de restringir su cambio de conformación a través de un puente adicional de disulfuro intercatenario que facilita su unión al antígeno limitando su capacidad de precipitación, pudiendo ser una posibilidad en la actividad en los inmunoensayos que le genere variabilidad a la respuesta aunque esto no está totalmente estudiado(Tizard,1982; McGuire *et al.*,1973). Otra variación en la respuesta inmune del caballo puede estar condicionada por estados de estrés, algún desorden alimenticio y aplicación de fármacos principalmente antiinflamatorios, debido a su traslado a los rastros o bien por lesiones que en el caso de de ser animales de carga son frecuentes y los dueños pueden simplemente venderlos debido a los altos costos de curación en estos animales (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2005).

1.7 Cuadro clínico de la Triquinelosis

1.7.1 Manifestaciones clínicas en el humano

Estas se dividen en tres períodos, el primero en la fase enteral donde los gusanos adultos se encuentran en el intestino, alrededor de la primera semana *post*-infección asociándose con gastroenteritis, diarrea y dolor abdominal. El segundo es la fase de migración que inicia una semana después de la infección con respuestas inflamatorias y alérgicas derivadas a la circulación de las LRN, provocando daño tisular, eosinofilia se presentan edemas muy importantes siendo muy evidentes en la cara (debido a que las larvas dañan los vasos sanguíneos); puede alterarse la tensión arterial provocando hipotensión o hipertensión, taquicardia o bradicardia, así como una gama de manifestaciones diversas dependiendo de los músculos afectados y la cantidad de larvas (Romero-Cabello, 2007).

Finalmente el tercero ocurre durante la fase parenteral, ahí la LRN invade el tejido muscular e induce la formación de la célula nodriza, desencadenando fiebre, mialgia, artralgia, dolor muscular e inflamación intensa que al formarse la célula nodriza se le considera un tercer periodo denominado parenteral franco donde aparece la deshidratación y las mialgias (Kociecka, 2000; Hernández-Vargas, 2016).

Dada la irregularidad y complejidad del cuadro clínico se ha considerado que la triquinosis puede cursar de manera subclínica o asintomática, oligosintomática y polisintomática; siendo una infección leve con la presencia de 1 a 50 LM por gramo de músculo, moderada de 50 a 100 LM y grave de 100 LM o más; el curso asintomático es debido a una baja presencia de LM en donde el paciente no refiere ningún tipo de malestar antes de 5 a 15 días post infección, mientras que el curso oligosintomático si lo presenta en el lapso de tiempo mencionado siendo los más comunes los de infecciones gastrointestinales que su dependencia y duración depende de la magnitud de la infección y la susceptibilidad del individuo (cuadro 4; de la Rosa y Gómez-Priego, 2008), por último el curso polisintomático se puede encontrar en la infección moderada y grave debido a su duración y localización. Las complicaciones graves son principalmente de tipo cardíaco, renal, pulmonar y neurológico que se pueden confundir con otras enfermedades con manifestaciones similares dificultando su correcto diagnóstico (cuadro 5; Gelal *et al.*, 2005; Puljiz *et al.*, 2005; Neghina *et al.*, 2011).

Cuadro 4. Principales signos y síntomas observados en la triquinelosis

Primeros 5 días de la infección y hasta los 15 días post infección	Siguientes 20-30 días de la infección
Malestar general	Mialgias
Dolor abdominal	Artralgias
Diarrea	Pérdida de peso
Cefalea	Contracciones musculares
Náuseas	Adinamia
Vómito	Sopor
Escalofrío	Zonas maculopapulares
Fiebre	Fiebre de 40 a 41°C
Eosinofilia	Meningoencefalitis
Fotofobia	Miocarditis
Aumento de la Fosfocinasa sérica	Coma
Edema localizado y generalizado	Muerte (en infecciones masivas)
Muerte (en infecciones masivas)	

Tomado de la Rosa y Gómez-Priego. (2008).

Debe considerarse que la sintomatología además de depender de la carga parasitaria puede influir el genotipo del hospedero y su estado inmunológico pero aun con la diversidad de síntomas se ha observado que el mantenimiento de la fiebre y la eosinofilia al comienzo de la invasión del tejido muscular por la LRN se mantiene hasta que las larvas han logrado encapsularse en las células musculares, prevaleciendo solo el dolor muscular durante meses (Monter-Villarreal, 2008).

Cuadro 5. Enfermedades humanas que tienen manifestaciones similares a la triquinelosis

Alcoholismo agudo	Intoxicación por plomo
Apendicitis	Intoxicación por ptomaína
Artritis	Laringitis
Asma	Malaria
Brucelosis	Meningitis
Gastroenteritis viral	Meningitis tuberculosa
Colecistitis	Miocarditis
Cólera	Miocarditis reumática
Conjuntivitis	Nefritis
Dermatomiositis	Neumonía
Angioedema	Neuritis intercostal
Encefalitis	Neuritis múltiple
Endocarditis	Papera
Enfermedades cardiacas	Paratifoidea
Enfermedades inflamatorias pelvianas	Pleuresía
Escarlatina	Poliomielitis
Erisipela	Reumatismo
Fiebre reumática	Sarampión
Fiebre tifoidea	Sífilis
Gastroenteritis	Sinusitis frontal
Influenza	Tétanos
Influenza intestinal	Tifo
Infección respiratoria de vías altas	Tuberculosis
Intoxicación alimenticia	Úlcera péptica

Tomado de Ramírez-Valenzuela (1981).

1.7.2 Manifestaciones clínicas en animales

En los animales pasa de forma asintomática aunque en invasiones masivas que ocurren rara vez se ha advertido una acción tóxica; a los primeros días (1-2) se observan trastornos intestinales, pérdida del apetito, trastornos en la masticación, vientre retraído y marcha dificultosa, además aparecen edemas en la cara y párpados durante la segunda y tercer semana de infección (Cervantes-Vázquez,1993).

Se ha reportado que se puede presentar un síndrome de enteritis hemorrágica a los 8 días posterior a la infección (p.i.) con posibilidad de cólicos, diarrea que al prolongarse provoca deshidratación; esto debido al incremento de la contractibilidad del yeyuno, destrucción de eritrocitos y la atrofia de las vellosidades debida a la fase intestinal manteniéndose durante tres meses. Por otro lado en la fase muscular se ha podido apreciar los síntomas de miositis aguda alrededor de los 15 días posterior a la infección incluidos la disfagia, la dificultad motriz, el trastorno en la masticación y el prurito en el rostro (Medina-Lerena,2007).

El caballo de igual forma puede ser asintomático y como el resto de animales presentar problemas motrices al grado de estar en postración, también llega a tener problemas de masticación los cuales pueden agravarse con la falta de apetito, si llega a presentar problemas a nivel de sistema nervioso se genera apatía y desorientación (Ocádiz-García, 1999).

Las infecciones que pueden confundirse con la triquinosis son la enterocolitis bacteriana equina por *Salmonella typhimorium*, *Escherichia coli* (parte de la flora normal) y *Klebsiella spp*, la infección llega a generar cuadros diarreicos severos destacando *S. typhimorium* por afectar en cualquier edad así como provocar la salmonelosis equina desencadenada por factores de estrés, cambio de dieta y alimento contaminado; además se puede asociar a enfermedades de otras etiologías como la neumonía y polioartritis (Nachon-Cicciarella y Bosisio,2005).

1.8 Diagnóstico en laboratorio

El diagnóstico en laboratorio para *T. spiralis* se clasifican como directo e indirecto.

1.8.1 El diagnóstico directo

La triquinoscopía se basa en la identificación de la larva en músculo esquelético de muestras cárnicas obtenidas de manera *post mortem*. Usualmente se utilizan en 10 g de diafragma o bien de músculos intercostales (aproximadamente 30 cm²), el tejido se monta en dos placas de vidrio comprimiéndole para su visualización al microscopio a 10 aumentos para encontrar las células nodrizas. Así, en el caballo, cerdos y roedores, la LM se concentra en el diafragma, maseteros, lengua y músculo abdominal siendo en el caballo la mayor presencia en lengua y maseteros seguidos por el diafragma y el músculo trapecio.

La triquinoscopía se caracteriza por ser una prueba sencilla y segura para el diagnóstico directo; sin embargo, la baja cantidad de muestra puede no identificar casos de infecciones leves, por lo que se requiere de experiencia en el manejo de la técnica. La desventaja de la técnica es que no se puede apreciar la presencia de LM hasta las 4 semanas *post*-infección debido que es el tiempo en que se desarrolla la LM, lo que hace que la triquinoscopía sea una prueba menos sensible que la digestión artificial. Por otro lado se tiene la digestión artificial que identifica a las LM libres de la célula nodriza mediante la disgregación de las muestras cárnicas (10 g o 30 cm²) en una solución de pepsina y ácido clorhídrico(jugo gástrico), la cual digiere el tejido muscular y la membrana de colágena de la célula nodriza para liberar las larvas del parásito recuperándose mediante sedimentación en un embudo de separación para su posterior observación en microscopio de campo claro o bien un microscopio estereoscópico con capacidad de entre 4 y 10 aumentos. La sensibilidad de la prueba es mayor al de la triquinoscopía pero menor que la determinación de anticuerpos por inmunoensayo (de-la-Rosa *et al.*, 2015; NOM-194-SSA1-2004).

1.8.2 Diagnóstico indirecto

Los métodos serológicos no sustituyen la observación del tejido infectado aunque la utilidad de la serología es adecuada para la vigilancia y la investigación epidemiológica tanto de animales domésticos como de vida silvestre. En la actualidad se emplean de manera rutinaria el ELISA y el Western blot (WB) para la determinación de anticuerpos en muestras de suero (Gamble *et al.*, 2004). La técnica de ELISA es la más empleada en la detección de anticuerpos que reconocen los antígenos contra *T. spiralis* ya que su sensibilidad le permite la detección de 1 larva por 100 gramos de tejido muscular y su mejoramiento se ha dado debido al uso de los productos de excreción y secreción (Dupouy *et al.*, 2007).

La técnica de Western blot es un método donde los antígenos PES de *T. spiralis* son separados en sus componentes mediante electroforesis en un gel de acrilamida/bisacrilamida y posteriormente son electro-transferidos a una membrana de nitrocelulosa (NC); los PES separados en tiras reactivas de NC se hacen reaccionar con suero de pacientes con sospecha clínica de triquinelosis. Si la muestra biológica evaluada contiene anticuerpos específicos en contra de los PES ocurre reacción antígeno-anticuerpo con lo cual el revelado inmunoenzimático se hace evidente añadiendo un conjugado inmunoenzimático y el sustrato correspondiente, obteniéndose bandas diagnósticas de reconocimiento específico. El WB permite reconocer las glicoproteínas específicas (45, 49, 55 kDa) de los productos de excreción y secreción de las larvas musculares no generan reacciones cruzadas con los antígenos de otros nematodos, siendo una prueba apoyo confirmatoria del contacto con el parásito (Sofrocnic-Milosavljevic *et al.*, 2005).

Los productos de excreción y secreción (PES) de la LM se emplean como antígenos para el ELISA y el WB, los cuales tienen valores de sensibilidad y especificidad mayores al 95% (Tinoco-Velázquez *et al.*, 2002; Gómez-Priego *et al.*, 2000). La respuesta inmune a la infección por *Trichinella* puede variar según

la dosis infectiva, en algunos casos la carga parasitaria ligera de 1 a 50 LM por gramo de músculo puede tardar hasta la segunda 2 semana en el desarrollo de anticuerpos p.i. en donde se presentan los antígenos de respuesta rápida, mientras en la carga masiva correspondiente a más de 100 LM puede ser alrededor de 4 semanas p.i. con la presencia de los antígenos de respuesta lenta (Arriaga-Díaz *et al.*, 1994; Nöckler *et al.*, 2005).

El grupo de respuesta rápida (localizados en cuticula, membranas internas, glándulas hipodérmicas, saco embrionario y granulos del tracto reproductor del macho) comparte antígenos de fosforilcolina (PC), presente en otros nematodos lo cual produce reacciones cruzadas en pruebas inmunoenzimáticas, localizándose tanto en su fase de LM como de GA, mientras los antígenos de respuesta lenta (presentes en los esticosoma, lumen del tracto digestivo y superficie cuticular) se obtienen de la LM en sus alfa-esticocitos (gp de 55-55 kDa) y las beta-esticocitos (gp de 48 kDa), provocando una respuesta humoral debido a los epitopos dominantes que contienen tivelosa (Takahashi, 1997).

Debido al interés de los investigadores y los acuerdos en la Comisión Internacional de Triquinelosis (ICT por sus siglas en inglés) por desarrollar técnicas más específicas, sensibles y rápidas para el diagnóstico serológico, consideradas en la investigación epidemiológica de animales domésticos y silvestres (Gamble *et al.*, 2004). Los estudios longitudinales han revelado que anticuerpos anti-*Trichinella* persisten por largos periodos en el cerdo (Nöckler *et al.*, 1995) sin presentar falsos negativos en los animales sacrificados, de igual forma se ha demostrado la estabilidad de los anticuerpos en los genotipos de *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. nelsoni* en jabalí al usar antígenos de productos de excreción y secreción para no confundir las infecciones con otros nematodos y homologar las técnicas diagnósticas entre ambos grupos de animales (Kapel, 2001).

En los caballos se han estudiado el desarrollo de los anticuerpos contra *Trichinella* mediante infecciones experimentales y de campo demostrando una respuesta serológica menos consistente que la observada en los cerdos aun teniendo gran cantidad de LM, por ejemplo se han utilizado dosis iniciales de 4000 hasta 40,000 LM y su respuesta fue alrededor de las 2 a 3 semanas p.i. con una disminución al transcurso del estudio con duración de un año, relacionándose esta situación a la falta de anticuerpos IgG específicos dado que se ha visto en circulación los cuatro isotipos de este animal (IgGa, IgGb, IgGc e IgGT) en donde no se abate la presencia de las larvas pero la presencia de anticuerpos circulantes desaparece dentro de los primeros 3 a 6 meses p.i (Pozio *et al.*,1999; Pozio *et al.*, 2002;Hill *et al.*, 2007^a), esto aunado a los altos costos en equipamiento y los tiempos de trabajo para poder monitorear los animales de consumo, obligando a seguir manteniendo el monitoreo mediante las técnicas directas que no previenen la infección al momento del consumo de carne infectada(Nöckler *et al.*,2000).

El inmunopunto o Dot-ELISA es una técnica de diagnóstico rápido opcional con bajo costo de material y tiempo de proceso, conservando la cantidad de antígeno empleado para cada ensayo en un nivel de nanogramos mientras que solo requiere 50µL de suero diluido del paciente, permitiendo detectar los diferentes componentes en su soporte pero sin ser específica al carecer de la separación previa mediante una carga eléctrica como en el WB. Esta capacidad le ha permitido emplearse en el diagnóstico de leishmaniosis, toxoplasmosis, malaria, tripanosomiasis y cisticercosis debido a que no modifica el antígeno y su resultado cualitativo es mediante la aparición de una mancha (Gaddam *et al.*, 2016; Swarna y Parija, 2008). Al emplear la membrana de nitrocelulosa para adsorber las proteínas del antígeno sin alterarlas, permite su fácil manipulación de trabajo, debido a que no requiere condiciones especiales para desarrollar la reacción como el ELISA y el WB (temperatura y exposición a la luz) y la concentración del antígeno no sobrepasa los 5µg por tira y su visualización de positividad es la presencia (Meza-Lucas *et al.*, 2016).

Recientemente el Dot-ELISA se ha empleado para el diagnóstico serológico de la triquinosis en cerdos, utilizando los antígenos de excreción y secreción con la finalidad de agilizar el tamiz de muestras para Western blot , teniendo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 100% siempre que la calidad del antígeno sea a partir de los PES, en otros estudios donde los agentes etiológicos se ocupo el extracto crudo se encontró que puede tener una buena sensibilidad (90-93%) y especificidad aceptable (85-88%), abriéndose la posibilidad de usarlo en más investigaciones (Aguilar *et al.*, 2000; Arjmand *et al.*, 2014).

1.9 Tratamiento para la Triquinosis

Se emplean diversos fármacos los cuales son fundamentales para la quimioterapia ante la infección, usando compuestos benzimidazólicos como albendazol (ABZ) y mebendazol (MBZ) para tratar triquinosis en animales empleándose tanto en medicina humana como veterinaria gracias a su amplio espectro antiparasitario, baja toxicidad hacia el hospedero y bajo costo (Coria-Paredes,2014).

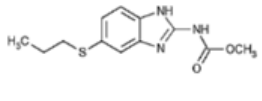
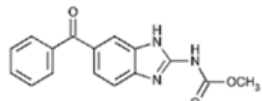
La acción de los derivados benzimidazólicos es de tres mecanismos principales:

1. En la unión selectiva de sus moléculas a la subunidad β de la tubulina de las células del parásito sin interactuar con las del hospedador, inhibiendo la polimerización y la formación de microtúbulos, responsables del movimiento de cromosomas durante la división celular, soporte estructural de las células tegumentarias e intestinales (Silvestre y Humbert, 2002).
2. Se inhibe el metabolismo de la glucosa dado que se afecta la enzima fumarato reductasa en la mitocondria (comprobado en el ABZ), produciendo el bloqueo irreversible para captación de glucosa en el GA y la etapa larvaria, ya que se agota el glucógeno, se interrumpe la síntesis de Adenosin trifosfato (ATP), provocando parálisis y muerte al parásito (Martínez-González *et al.*, 1998).

3. Se interfiere el transporte transmembranal de glucosa exógena, alterando severamente el gradiente transmembranal de protones e interfiriendo en la producción de energía (ATP) generándole la muerte (Sharman y Anand, 1997).

A continuación se resumen otros aspectos de ambos fármacos (cuadro 6):

Cuadro 6. Otras características de los fármacos más utilizados en la quimioterapia de la triquinelosis

Fármaco	Estructura	Dosis Adulto	Semivida	Metabolismo	Excreción
ABZ	 <p>Unión a grupo funcional alifático</p>	400mg/día por 8-14 días	8.5 horas	Absorción sistémica del 22% Unión al 95% de proteínas plasmáticas. Metabolismo de primer paso. Metabolito activo sulfóxido de albendazol	Excreción biliar en forma de conjugados y metabolitos. Aparece poco en orina.
MBZ	 <p>Unión a grupo funcional aromático</p>	200-400mg/día por 3 días y después continuar con 400-500mg/día por 10 días más	2.8-9 horas	Absorción sistémica <5%, mejora si se consume alimentos ricos en grasas. Se metaboliza por descarboxilación a un metabolito inactivo.	Excreción biliar en forma de conjugados y metabolitos. Aparece en orina 5-10%. A las 24 o 48 horas después de la administración

Adaptado y modificado de Coria-Paredes (2014).

La eficacia del tratamiento solo es considerado en la fase intestinal al emplear MBZ que se ve beneficiada por las altas concentraciones de fármaco en el GA que se encuentran en la lámina propia del duodeno, mientras que el ABZ ha tenido buenos resultados en la fase larvaria y efecto parcial en el adulto empleando el modelo murino (Chung,2001), al momento de estar formada la célula nodriza ésta actúa como una barrera que evita la acción de los fármacos provocando una falla terapéutica (Pozio *et al.*, 2001).

La supervivencia de la LM se ha visto debido al uso de dosis bajas en los fármacos mencionados en la quimioterapia y de manera experimental los ratones infectados tuvieron un porcentaje de eliminación de 70-80% de los GA y 90% fue de las LM del 70-80% y 90%. Se teoriza que el empleo de bajas dosis de los fármacos pueden afectar al parásito mientras duran en circulación y no son consumidos en su totalidad por él (de-la-Rosa-Arana *et al.*,2007); otro aspecto es la resistencia a los bencimidazoles en donde los parásitos resistentes se vuelven dominantes gracias a los cambios en la secuencia de aminoácidos

en los dominios N-terminal e intermedio de la β -tubulina perdiéndose la afinidad de los bencimidazoles a la tubulina del parásito por sustitución de residuos como fenilalanina por tirosina en posición 167 (F167Y), glutamato por alanina en posición 198 (E198A) y fenilalanina por tirosina en posición 200 (F200Y), impide la formación de puentes de hidrógeno que estabilicen el complejo tubulina-bencimidazol (Beech *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2004; Aguayo *et al.*, 2013).

Todo esto puede deberse a un proceso hereditario e irreversible del parásito al momento de la selección y reproducción de los nematodos, aumentando la frecuencia de genes resistentes mediante una mutación (alteración del DNA en la célula cambiando su función ante el fármaco), amplificación genética (activación exagerada de genes que incrementan la producción de sustancias que afecten la acción del fármaco) y transferencia genética (adquisición de material genético de otro ambiente u organismo a uno de sus cromosomas confiriéndole resistencia al fármaco) en la población tratada con el antihelmíntico (Torres-Vásquez *et al.*, 2007).

1.10 Control y Prevención

El objetivo principal de todas las medidas preventivas es evitar la ingesta cruda o mal cocida de carne infestada. Su control en nuestro país se logra mediante la inspección de carne bajo los lineamientos de la NOM-194-SSA1-2004 de los establecimientos que se dedican al sacrificio y faenado de animales de abasto, en la que se establece en su inciso 6.10.1 en relación a los parásitos (cuadro 7) y las especies animales que llegan a los establecimientos tipo inspección federal (TIF):

Cuadro 7. Limite de inspección para parásitos en animales faenados

Agente etiológico	Presencia o ausencia del parásito	Especies de ganado
Cisticerco	Ausente	Porcinos
Quiste hidatídico	Ausente	Bovinos y ovinos
<i>Trichinella sp.</i>	Ausente	Porcinos y equinos
Cisticerco bovis	Ausente	Bovinos

Tomado y modificado de la NOM-194-SSA1-2004.

Su inciso 8.5 define la detección de *Trichinella spiralis* en los establecimientos dedicados al sacrificio de ganado porcino y equino de la siguiente manera:

1. Se realiza toma mensual con dos muestras por canal de equino o porcino de un tamaño mínimo de 3cm², que procedan de ambos pilares del diafragma en su paso a la porción tendinosa, colocándose en recipientes limpios con tapadera y debidamente identificados conforme a la canal.
2. Las muestras deben tomarse de canales que provengan de la misma granja, región o introductor.
3. Las muestras deben constar con 20 submuestras (se vuelve a pesar las porciones de carne siendo estas de menor o igual peso a la muestra inicial) provenientes de diferentes canales.
4. Todas las muestras se envían a un laboratorio autorizado por la Secretaría de Salud(SSA) para su determinación correspondiente mediante el método de digestión artificial usando una solución de pepsina y ácido clorhídrico en proporción 1:19 en agitación constante y recuperando en un vaso de precipitado con una malla de 2mm de apertura.
5. El resultado que se reporta es ausencia o presencia de *Trichinella spiralis*.

Todo este seguimiento es debido a que la carne de cerdo es la fuente más importante de transmisión de la triquinelosis en el hombre, aunque en las últimas décadas del siglo XX se dieron grandes brotes en Europa atribuidos a la carne de caballo infectada por su demanda y bajo costo (Berumen-de la Torre, 2002), lo cual generó una mayor precaución de las autoridades Internacionales y nacionales(cuadro 8) en la inspección de la carne para exportación; la regulación francesa acordó a partir del año 2000 que la inspección de muestras debía realizarse de dos muestras de al menos 50g cada una en los sitios predilectos de las LM en la carcasa del caballo siendo uno la lengua y el otro de los pilares del diafragma(Touratier, 2001), mismo que se ha manejado al momento de las

exportaciones de carne de cerdo y caballo mediante las normas de la Comunidad Europea a través de la Regulación EC No 2075/2005. No obstante existen mataderos privados que no cuentan con las normativas requeridas y la costumbre del mantenimiento de los animales de traspatio los cuales no reciben una inspección sanitaria después del sacrificio ha sido considerado como la causa de encontrar carne infectada debido al contacto que puede tener el caballo con los cerdos y/o animales de vida silvestre (Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

La prevención de la triquinelosis humana tiene tres enfoques principales (Gómez de Anda, 2012):

- a) Generar la educación al consumidor sobre el riesgo del consumo de carne cruda o semicruda de productos cárnicos ya sea animales domésticos (caballo y cerdo) y silvestres (Jabalí, oso, etc.) que pueden ser portadores de *Trichinella* y carezcan de inspección zoosanitaria para su consumo.
- b) La crianza de cerdos por ser la fuente principal de la infección en seres humanos.
- c) El control de todos los animales susceptibles (tanto domésticos como silvestres) por la metodología normalizada en cacería y sacrificio.

Cuadro 8. Principales Instituciones de control zoonosario a nivel nacional e internacional.

Organización reguladora	Jurisdicción	Propósito
Organización mundial de comercio (WTO por sus siglas en inglés)	Internacional	Apoya el comercio internacional en todas sus facetas así como facilitar el flujo comercial entre todos los países miembros.
Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO)	Internacional	Marca las reglas básicas para establecer inocuidad alimentaria y los estándares de salud para los alimentos de origen animal y vegetal.
Comisión del Codex Alimentario (CODEX)	Internacional	Desarrolla lineamientos, guías y propuestas de estándares en materia alimentarias a escala internacional.
Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE)	Internacional	Se encarga de mejorar la sanidad animal en el mundo.
Comisión de la Unión Europea (UE)	Europa	Genera el establecimiento y diseño de la normatividad para la inocuidad alimentaria, salud y bienestar de los animales exportados o sus productos en la UE.
Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés)	Estados Unidos	Busca que los productos de origen animal en este caso, lleguen al mercado de manera segura antes de ser consumidos.
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)	Argentina	Dar garantías sanitarias a las exportaciones e importaciones de materias primas de la producción agroalimentaria en Argentina.
Secretaría de Salud (SSA)	México	Institución nacional encargada de proteger la salud humana mediante la Ley General de Salud, fortaleciendo la rectoría de la autoridad sanitaria y la intersectorialidad.
Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)	México	Organismo administrativo descentralizado de la Secretaría de Agricultura y Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) vigila la inocuidad de los alimentos que se importan, exportan y se movilizan del territorio nacional.
Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA)	México	Órgano asesor de SAGARPA en materia zoonosaria para la identificación, planeación programación, operación, seguimiento, control y evaluación de los programas de sanidad y producción animal en el territorio nacional.
Dirección General de Salud Animal (DGSA)	México	Expide los certificados Zoonosarios para la movilización de animales, productos y subproductos de origen animal en el territorio nacional.

Adaptado y modificado de Gómez-de Anda (2012)

En caso de encontrarse la carne contaminada se deben utilizar métodos de inactivación del parásito que aplican tanto para carne comercial y no comercial, de los cuales tres métodos han sido fiables para dicha inactivación (Gamble *et al.*, 2000; Gajadhar *et al.*, 2009):

a) Calentamiento hasta alcanzar una temperatura interna de al menos 71 °C por lo menos 5 minutos, se aprecia el cambio de color de rosa a gris y las fibras musculares se separan fácilmente unas de otras.

b) Congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (no es muy recomendable dado la resistencia de algunas especies y en estudios comparativos entre carne de cerdo y carne de caballo se ha visto que este último requiere un mayor tiempo y menor temperatura para inactivar las larvas (Hill *et al.*, 2007^a).

c) Irradiación ya sea por rayos X o con haz de electrones, este método está aprobado por la FDA y respaldado por la WHO y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés).

Mediante otros procesos de conservación de la carne de cerdo se ha visto que la capacidad reproductiva de *Trichinella* no se ve afectada aun si emplea el uso del adobo, se realiza curado o bien la preparación de embutidos, pero se ha podido apreciar que la cepa mexicana en condiciones prolongadas de enfriamiento disminuye su capacidad reproductiva (Medina-Lerena *et al.*, 2009).

1.11 Situación epidemiológica

1.11.1 Presentación en el hombre.

El parásito del género *Trichinella* es cosmopolita, pudiendo encontrarse en todos los continentes excepto la Antártida ha tenido una prevalencia global del 27.8% principalmente por el consumo de carne de cerdo en el 66% de los casos (figura 8), desde su descubrimiento por Peacock en 1828 y Hilton en 1833 en cadáveres humanos en Inglaterra, por otro lado por el crédito a James Paget quien se le atribuyó el descubrimiento del “gusano encapsulado” son considerados las primeras observaciones en humanos, mientras las primeras observaciones en animales como el cerdo se realizaron por el doctor Joseph Leidy en 1846 en Filadelfia, Estados Unidos, quien encontró larvas encapsuladas en los músculos extensores del muslo de cerdo cocido similares a los que observó en músculos de cadáveres humanos (Molina y Galaviz, 2013; Ramirez-Valenzuela, 1981).

El zoólogo británico Richard Owen denominó al parásito como *Trichinella spiralis* en 1835 a partir de las muestras de Paget, con esto se llegó a relacionar a uno de los hallazgos más antiguos de *Trichinella* de 1200 a.C. al músculo intercostal de una momia egipcia en la tumba de Najt examinada en 1974, se cree hubo varias epidemias descritas en la historia (Sicilia en 427 a.C. y en Oriente medio) (Correa-Beltrán *et al.*, 2006), solo reportándose la especie de *T. spiralis* hasta la tipificación isoenzimática propuesta por Pozio (1987). Esto marcó el panorama de los modelos de estudio y las pruebas de laboratorio tanto directo como indirecto para la confirmación del diagnóstico clínico de *Trichinella* y sus diferentes especies en el hombre y los animales susceptibles a la infección principalmente el cerdo (Krivokapich *et al.*, 2006).

Hasta el momento se han reportado brotes en 55 países con un promedio anual de 5751 casos y 5 defunciones de los cuales históricamente se le atribuyó al consumo de carne de cerdo (64%) y en menor medida al caballo, animales de vida silvestre destacando el oso y el perro como hospedero sinantrópico (Devleeschauwer *et al.*, 2015; Murrell y Pozio., 2011; Pozio, 2007).

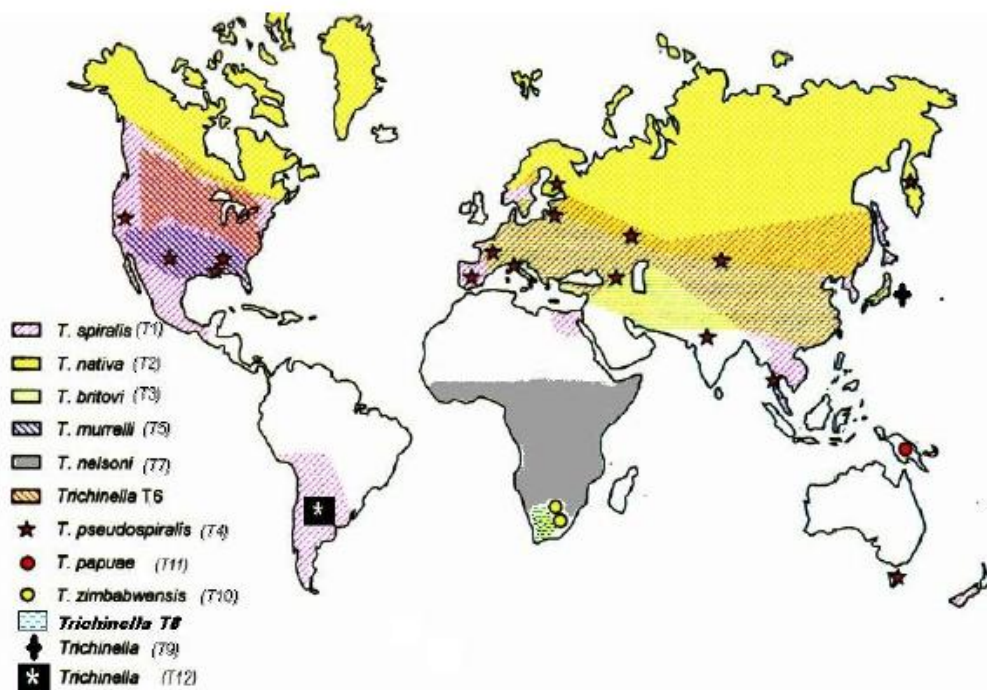


Figura 8. **Distribución del género *Trichinella* en el mundo.** Se muestra la distribución de los 12 genotipos del género *Trichinella*. Tomado y modificado de Gottstein *et al.*, 2009.

1.11.1.1 Europa

Los siguientes brotes reconocidos y atribuidos al consumo de carne de cerdo fueron en la ciudad de Hettstadt (1863) con 158 enfermos y 27 muertos, y Hedersleben con 337 enfermos y 101 muertos en Alemania, al pasar esto el investigador Rudolf Virchow sugirió la práctica de la inspección triquineloscópica en todos los cerdos sacrificados (Ramirez-Valenzuela,1981). Para 1881 se hizo frecuente el ingreso de carne infestada al sur de Francia por carne de la unión americana lo cual fue vetada del país, forzando a Estados Unidos para realizar el control de carne de cerdo mediante triquinoscopía que por diferentes factores económicos no se continuó por las guerras mundiales, con respecto a los años 1887 a 1930 en Italia se encontraron los primeros brotes en humanos atribuidos al consumo de carne de cerdo (uno en los años 1887, 1900, 1912 y 1930, y 20 con dos defunciones en 1917), Italia continuó presentando brotes con mayor número de personas en diferentes poblados de Sicilia entre los años 1933 a 1946 y con la entrada de carne importada de caballo, el consumo de Jabalí y zorro se mantuvo desde 1975 hasta el 2005 con las especies de *T.britovi* y *T. spiralis* (Pozio *et al.*, 1997).

Entre los años 1975 a 2005 Francia e Italia fueron los países más afectados a partir de los brotes ocurridos por el consumo de carne de caballo importada, el primero con 2296 casos en ocho brotes y el segundo con 1031 casos en siete brotes lo que generó la implementación de los controles veterinarios en 1985 (Boireau *et al.*, 2000; Pozio, 2015), los caballos infestados fueron originarios de países de Europa del Este incluidos la ex Yugoslavia, Polonia, Serbia, y Rumania, mientras de Norteamérica fueron Canadá, México y Estados Unidos (Ancelle *et al.*, 1998; Cuadro 9).

Finlandia tiene registro de brotes de triquinelosis desde el año 1860 mediante autopsia en 1000 cadáveres humanos descritos por Hjelt (1872) y solo 3 casos en pacientes de la ciudad Roukolahti al sur de Finlandia en el año 1890. A principios de 1980 se reportaron 5 cerdos infectados, cantidad que se fue

incrementando entre los años 1983 a 1992 con un total de 240 animales hasta que entre 1995 a 2003 esta cantidad disminuyó a una prevalencia de 0.002% mientras de manera paralela a partir del año 1990 al 2003 se examinaron 30,282 caballos sin resultados positivos mediante digestión artificial (Oivane, 2005).

Suecia ha tenido 9 brotes entre los años 1917 a 1969 con 489 casos atribuidos por el consumo de carne de oso y cerdo (Odelram, 1973) finalizando con 1 caso por consumo de chorizo español en 2007 (Gallardo *et al.*, 2007), Estonia 4 (1960-1969) y 91 en el periodo 1986-2009 (Järvis *et al.*, 2001), Lituania Lituania 3,979 (1986-2009); 25 por carne de cerdo (2010) y 10 por jabalí (2014), teniendo reportes anuales con un rango de casos entre 6 a 819 personas con triquinelosis en los años 1969 a 1995 (Ročkienė y Ročka, 1997; Bartuliene *et al.*, 2009).

Alemania tuvo 82 casos por cerdo y 1,027 por caballo (1990-1998), 52 entre 1998 a 1999, 5 casos en 2004 hasta mantenerse con 186 casos acumulados en 2009 y 13 casos en 2013 por consumo de jabalí (Pozio, 2000; Nöckler *et al.*, 2004; Littman *et al.*, 2006; Faber *et al.*, 2015).

Grecia empezó a reportar desde 1946 por Liveriatos (1948) con 6 personas infestadas, mientras en 1952 Papadakis *et al.* (1956) y Panagiotopoulos y Valtis se encontraron con 22 casos en el centro y 1 al norte de Grecia y después se revisaron 15,704 cerdos sacrificados entre 1952 y 1953 en los poblados de Thessaloniki y Atenas, encontrándose una incidencia del 0.74% la cual disminuyó en revisiones posteriores hasta 1958 con 57,165 cerdos con una incidencia del 0.12%, con todos los esfuerzos en la revisión de carne de cerdo solo se ha reportado un caso de en humanos hasta el 2009 (Sotiraki *et al.*, 2001; Berger, 2015).

Noruega detectó la triquinelosis en humanos hasta 1953 en donde se involucraron 3 personas de 6 brotes y entre los años 1950 a 1960 las evaluaciones de cerdos lograron detectar por lo menos 37 positivos en granjas (Skjerve, 1993).

España presentó cinco brotes en donde se afectaron 86 personas en la zona sur del país (Andalucía) entre los años 1984 y 1987 por el consumo de carne de cerdo y jabalí y en donde se empleo la técnica serológica de ELISA para la búsqueda de anticuerpos en los individuos y la digestión artificial en las muestras de la carne de los animales consumidos (Rodríguez-Osorio *et al.*, 1990). En el año 2000 se encontraron 38 personas infestadas y entre el 2001 al 2002 26 casos fueron diagnosticados (Cortés *et al.*, 2002; Gómez-García *et al.*, 2003) teniendo acumulados 1244 casos hasta el 2009. Por último a partir de una investigación entre los años 1986-2009 por Murrell y Pozio se documentaron los siguientes países con la siguiente relación de casos: Albania 3 (1999-2003) , Andorra 1 (1999), Austria 72 con 7 defunciones (1866) sin registro hasta 1970 con casos importados y 12 entre 2000-2011 (Lechner *et al.*,2012), Bélgica 1 (1893) 1 por consumo de jabalí (1978) y 16 en 2014 (Cardoen *et al.*, 2010;Messiaen *et al.*,2016), Bosnia y Herzegovina inicio con dos brotes en 1955 y 1975 hasta llegar a 1,600 casos en 1993-2003 (Ravlija *et al.*, 2006), Bulgaria con 137 brotes (1971-1990) y 4,108 (1990-2006), Bielorrusia 268 (1987 a 1994), Croacia 2,110 (1994-2009),República Checa 31 (1986-2009),Dinamarca 7 (2004) y 1 (2007), Escocia 2 (2010,2014), Eslovaquia 440 (1986-2008) por carne de perro, Eslovenia 203(1989-2006), Georgia 24 (1980-1984); 475 (1985-1989); 1,151 (1990-1994) y 331 en 1995-1998 (Berger,2016), Hungría su primer caso fue en 1891 solo siendo documentado hasta 1980 teniendo 158 casos (1986-2009); Irlanda 8 (1956), 26 (1968), 50 (1969) y 2 (2007), Letonia o Latvia 636 (1986-2009) y 6 (2011), Macedonia 6 (1992), Países Bajos 2 (2004), Polonia 11,643 (1946-1965) y 3,084 (1986-2007) 23 por carne de jabalí en 2011 (Sadkowska-Todys y Golab,2013), Portugal 5 (1962) y 1 (1967), Reino Unido 1 (1879); 7 (1940-1941); 107 con una defunción (1952-1953); 39 (1975-2007) 8 de estos por consumir salami de origen serbio(Milne *et al.*, 2001), Rumania 2,610 (1980-1989); 28,564 y una defunción (1986-2007) y 91(2007-2009) , Rusia 1,720 (1993-1994); 970 (1996-2002) parte de estos casos por consumo de carne de oso (Ozeretskoykaya *et al.*,2005);18 por perro, 8 por morsa y 33 por tejón (2005, 2008 y 2009), Serbia y Montenegro 5,210 (1994-2003) y 2,257 con 3

defunciones acumulados hasta 2010, Suiza 4(1994,2009) y Ucrania 1,210 (1986-2009); dichos países se les a considerado con infecciones emergentes y algunos de ellos como recientes miembros de la UE (Letonia, Lituania y Estonia) presentan los brotes cada año (García *et al.*, 2005 ; Webster *et al.*, 2006;Kurdova *et al.*, 2004; Murrell y Pozio, 2011).

Cuadro 9. Brotes de triquinosis por consumo de carne de caballo en Francia e Italia 1975 a 2005.

País	Año	País de origen del caballo	Casos y defunciones	Especie de <i>Trichinella</i>
Francia	1975	Europa del este	125/0	ND
Italia	1975	Ex Yugoslavia	89/0	<i>T. britovi</i>
Italia	1984	Ex Yugoslavia	13/0	ND
Francia	1985	EEUU	431/2	<i>T. murrelli</i>
Francia	1985	Polonia	624/3	<i>T. spiralis</i>
Italia	1986	Ex Yugoslavia	300/0	<i>T. britovi</i>
Italia	1990	Europa del este	500/0	<i>T. spiralis</i>
Francia	1991	EEUU	21/0	ND
Francia	1993	Canadá	538/0	<i>T. spiralis</i>
Francia	1994	México	7/0	<i>T. spiralis</i>
Francia	1998	Serbia	128/0	<i>T. spiralis</i>
Francia	1998	Serbia	404/0	<i>T. spiralis</i>
Italia	1998	Polonia	93/0	<i>T. spiralis</i>
Italia	2000	Rumania o Polonia	36/0	<i>T. spiralis</i>
Italia	2005	Europa del este	7/0	<i>T. britovi</i>

Tomado y modificado de Pozio y Zarlenga 2005; Liciardi *et al.*, 2009. Las especies se obtuvieron mediante tipificación de 10 genes para isoenzimas (LDH, ME, 6PGD, G6PD, GOT, AK, PGM, ACON, MPI y GPI) descrito por Pozio en 1987. ND (no determinado).

1.11.1.2 América del Norte

Mediante las investigaciones de Zimmerman (1970) donde reportó a partir de las investigaciones entre los años 1930 a 1940 parámetros de la infección de 16% a 28% de la población humana de los Estados Unidos, dicha prevalencia se vio reflejada en las granjas industrializadas de Canadá, Estados Unidos y Europa occidental hasta un valor del 50%. (Ancelle *et al.*, 1998). A partir de eso se fueron reportando los casos mediante el sistema nacional de vigilancia en triquinosis que reportaba anualmente en promedio 400 casos durante 1947-1951, con 300 casos y disminuyendo en un rango de 100 casos hasta 1977. En 1978 con 91 como consecuencia se disminuyó la incidencia de casos hasta llegar a una relación de 57 anuales (1982-1986), 206 casos (1987-1990), 230 casos (1991-

1996), 33 brotes y 72 casos (1997-2001), 16 brotes y 54 casos (2002-2007), 40 brotes y 84 casos (2008-2012); por último 9 casos (2013) debido al consumo de jabalí. Otros sitios pertenecientes a la unión americana son Alaska y Hawaii; el primero tuvo su mayor reporte con 47 casos en 1978 principalmente por el consumo de carne de morsa, 45 casos (1991-1993), 6 (2000-2001), 10 (2002,2005) y 6 (2009,2012); el segundo reportó el 7.4% en cadáveres(1964), se continuo con 9 casos (1975-1985), 3 (1986) 2 (1993) y 1 (2000), las islas no volvieron a reportar nuevos casos al CDC. (Zimmerman, 1984; McAuley *et al.*, 1991; Moorhead *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2015).

En Canadá se registraron pocos brotes a partir de 1974 con 49 casos, 3 (1975), 31 (1976), 116 (1982-1987) por consumo de carne de morsa y 257 (1987-2009). Groelandia presentó 420 casos y 37 defunciones (1940-1950) por consumo de carne de morsa y oso, finalizando solo con 3 casos en 2016 por carne de oso (Greenbloom *et al.*, 1997; Moller *et al.*, 2005; Dupouy *et al.*, 2016).

1.11.1.3 Asia

La enfermedad se consideró a partir de los años sesentas y setenta en donde el primer reporte de brote se dio en Tailandia a partir de 1962 acumulando hasta 2005 con 130 brotes con un total de casos de 7,392 con 97 defunciones y 50 casos entre 2006-2007 (Kaewpitoon *et al.*, 2006; Kusolsuk *et al.*, 2010). En el caso de Japón se detectaron tres brotes de importancia: el primero con 15 casos (1974), el segundo con 12 casos (1980) y el tercero con 60 (1981) todas atribuidos al consumo de carne de oso, se reportó entre los años 1999 a 2005 solamente 4 casos (Acha y Szyfres, 2003; Takahashi *et al.*, 2000).

China ha reportado la presencia de larvas en cerdo, perro, ovino y osos, teniendo tres grandes periodos: 1960 a 1974 que iniciaron con 10 brotes con 276 casos y 12 muertos hasta acumularse un total de 4,033 casos y 73 muertes, el segundo fue a partir de la década de 1980 en donde se dieron zonas

endémicas al centro y al sur del país acumulándose hasta 1989 15,599 casos con 141 muertes, acabando con el tercero desde 1990 a 2002 con 5,529 casos con 26 muertes, para finales de 2009 se acumularon 1,137 donde la relación a la mayoría de casos fue por consumo de carne de cerdo con *T. spiralis* y al perro con *T. nativa* (Wang y Cui,2001; Liu y Boireau,2002;).

Laos ha tenido pocos reportes a diferencia de los países mas endémicos del continente asiático como lo son Tailandia y China, lo cual se ve reflejado con 51 casos en 1975 y lo encontrado en los años 2004 a 2006 con 123 casos los cuales se debieron a dos grandes eventos familiares, hubo al menos 650 pacientes que fueron descartados mediante pruebas serológicas (Barennes *et al.*, 2008). Los siguientes países han presentado de manera esporádica casos: Bután 2 (1996), Camboya 24 casos (1975-1984), Hong Kong un brote (1983) y 20 casos (1986), India 3 (1996-2002) y 42 casos con 11 defunciones (2008-2011) considerado el primer reporte con múltiples brotes en la India (Sethi *et al.*, 2010), Indonesia en 1993 con 23 niños con presencia de anticuerpos contra *Trichinella* (Chomel *et al.*, 1993), Malasia 2 (1997,2011), Nepal 20 (1986), Singapur 25 (1998); Vietnam 26 (1970), 22 (2001), 20 (2004), 22 (2008) y 36 (2012) debidos a consumo de carne de cerdo y jabalí (Van De *et al.*,2015); Kazajistán un brote (1998) y 17 casos (2000), Kirguistán 10 (1996), Corea del Sur 2(1997) 8 (1999-2003), 20 (2010) , 2 (2012) y 6 (2014) por carne de tortuga(Kim *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2015); Uzbekistan un brote (1965) y Taiwán 8 casos por carne de tortuga en 2009 (Lo *et al.*, 2009).

1.11.1.4. Oriente medio

Muchos de los países afectados en este apartado han sucedido a grupos humanos cuyas costumbres religiosas no tienen prohibido el consumo de la carne de cerdo o jabalí así como el consumo de animales de origen silvestre. Israel es el país con más desarrollo de casos y brotes muchos debidos en poblados cristianos o por trabajadores extranjeros: 39 (1971), 6 (1982) 1 brote (1992), 111 (1999), 13 (2000), 230 (2002,2004) , 30 (2007); Irán 6 (2007) ,

Líbano 1 brote (1970), 10 (1975), 1000 (1982) y 44 (1995); Siria 1 brote (1990) y Turquía 425 acumulados entre 2003 y 2004 (Turk *et al.*, 2006; Olaison y Ljungström, 1992; Haim *et al.*, 1997).

1.11.1.5 África

La región africana está conformada por 46 países de los cuales hay poca documentación de triquinosis destacando Etiopía con 8 (1986) y 20 (1990), Kenia un brote (1972), Zambia 1 caso (2000), Tanzania 11 casos y 2 defunciones (1977), Egipto solo se ha reportado la momia de la tumba Najt pero 6 turistas franceses presentaron la infección (1976); misma situación se dio en Senegal por consumo de jabalí verrugoso con 9 casos (1960) y 3 (2009), por otra parte solo se reportó a un francés por consumir carne de chacal en Algeria en 2004 (Bura y Willet, 1977; Dupouy *et al.*, 2009; Nezri *et al.*, 2006).

1.11.1.6 Oceanía

La triquinosis es rara en esta región del planeta pero el riesgo se mantiene debido a la presencia de roedores, cerdos y caballos que han salido positivos en las pruebas de digestión enzimática, hasta el momento solo se han encontrado 4 casos (1931-2001) en Nueva Zelanda y 153 personas con presencia de anticuerpos en Nueva Guinea, a pesar de tener reportes sobre la infección en los hospedadores sinantrópicos y los hospedadores del ciclo doméstico (Thornton y King, 2004).

1.11.1.7 América Latina

El vestigio más antiguo en Latinoamérica es hasta el momento la momia del Cerro El Plomo, Chile de un niño Inca de 8 a 9 años de edad perteneciente al periodo del año 1500 encontrado en 1954, el cual mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) con suero humano hiperinmune para *Trichinella sp* se demostró que los quistes presentes en su cuerpo correspondían a una triquinosis, lo cual generó una gran controversia considerando la existencia del parásito antes de la

invasión española(Rodríguez *et al.*,2011). En la Argentina se ha observado la infección debido a cerdos infestados lo cual lo volvió un país endémico, su primer reporte fue en 1898 en Buenos Aires y el primer brote en 1969 con el número de casos que llegó hasta 908 (1971-1981), 8,806 (1990-2006) ; aparentemente solo se consideraban los casos debido al ciclo doméstico que incluía a cerdos , humanos y roedores pero la inclusión de los animales del ciclo silvestre en la infección en humanos se han debido al consumo de carne de puma, armadillo y jabalí que también fue influenciado por la migración europea (principalmente españoles e italianos) durante los primeros años del siglo XX con los métodos de preparación de carnes (Ribicich *et al.*, 2005). Un estudio epidemiológico realizado con muestras de la provincia de Santa Fe entre 1998 y 2009 identificó 27 brotes con 1157 casos con 224 comprobados mediante pruebas serológicas (IFI) asociándoles al consumo de productos elaborados con carne de cerdo como embutidos, salamines y chorizo fresco (Sequeira *et al.*, 2013).

Bolivia ha empleado la técnica de ELISA para evidenciar anticuerpos anti-*Trichinella* en suero de cerdos de las regiones del Antiplano(zona de baja crianza del cerdo), Chuquisaca y Santa Cruz (estos últimos con la mayor población de cerdos 59.9%) y solo 7 casos de personas asintomáticas obtenidos en el estudio a 234 personas de la zona rural en la provincia Cordillera (1999), esto debido a que las personas de la región están expuestas al consumo de la carne proveniente de rastros clandestinos con esto se sabe que ha sido el primer reporte en humanos a pesar de los reportes previos en cerdos (Bartoloni *et al.*, 1999).

Chile es otro de los países endémicos de América latina que al igual que Argentina y México ha tenido brotes a causa del consumo de la carne de cerdo, se dieron seis brotes (1962-1982) con 2267 casos (1963-1990), 698 casos (1991-2004); solo se ha encontrado en cadáveres Uruguay 3 (1943);Venezuela 15(1972) y 1(1974) mientras se ha mencionado su existencia en Cuba y Paraguay sin evidencia de laboratorio(Schenone *et al.*,2002).

México ha tenido presente esta parasitosis desde los últimos años del siglo XIX en los cerdos desde 1862 pero fue hasta 1891 que se diagnosticó al parásito en cadáveres estudiados en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México por el Dr. Manuel Toussaint mediante preparados por disgregación y por sección microtómica dichos trabajos se continuaron mediante la observación del tejido infectado y posteriormente mediante la digestión artificial en el estado de México y la ciudad de México (Cuadro 10).

Cuadro 10. Casos humanos confirmados por hallazgo de larvas de *Trichinella spiralis*

Autor	Año	Procedencia	# casos
Barragán	1893	Ciudad de México	4
Olvera	1896	Ciudad de México	12
López Vallejo	1916	Edo. de México	5
Henríquez	1941	Ciudad de México	8
Perrin T.	1942	Ciudad de México	25
Mazzotti y Chavira	1943	Ciudad de México	120
Mazzotti y Pastrana	1944	Ciudad de México	144
Martínez Marañón	1974	Ciudad de México	42

Tomado y modificado de Tay-Zavala *et al.* (2004).

Se presentaron algunos reportes desde 1952-1974 en la Ciudad de México y posteriormente en Zacatecas (1975) volviéndose muy frecuente la presencia de brotes anuales durante 1981-1985, pero el mayor número de casos reportado en el país fue en la ciudad de Delicias, Chihuahua siendo 166 y un solo muerto (Hernández *et al.*, 1992; Tay-Zavala *et al.*, 2004).

Con la llegada de los métodos serológicos a partir de 1980 se lograron realizar estudios tanto en humanos como en animales sin la necesidad de biopsia empleándose los antígenos purificados del parásito (Correa-Beltrán *et al.*, 1997).

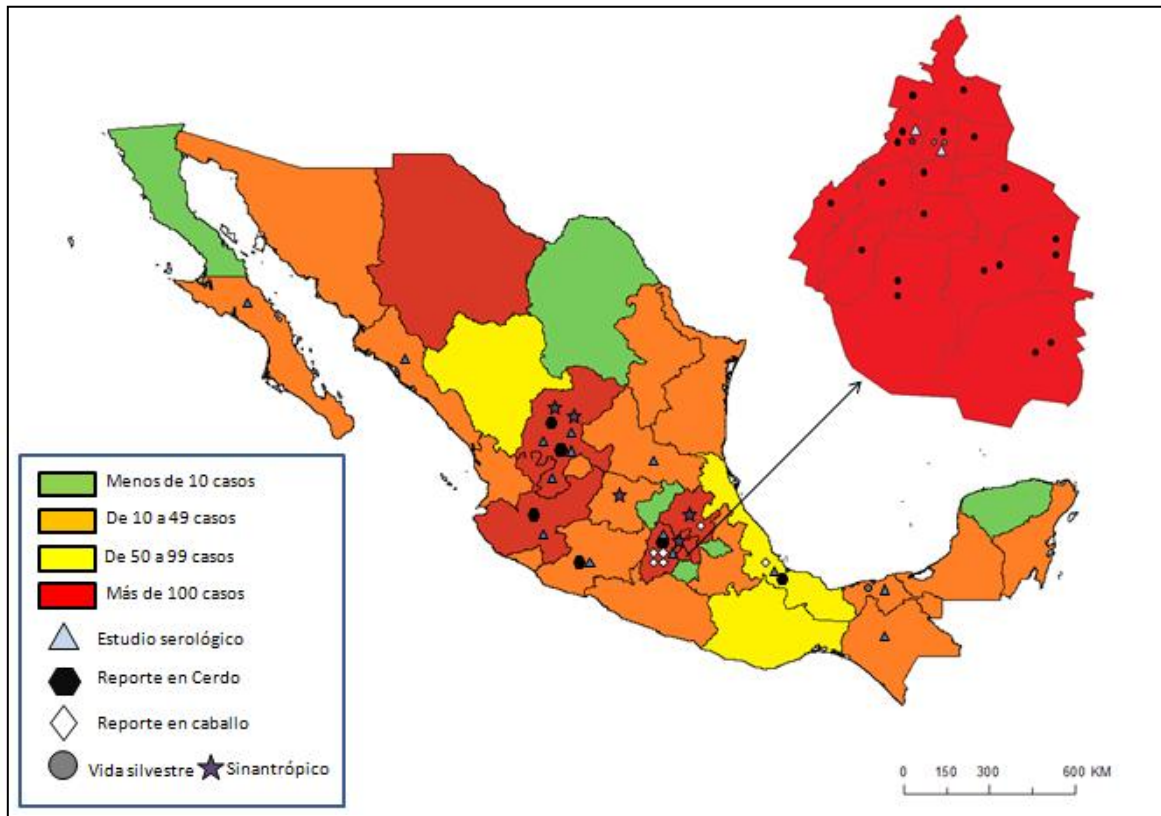


Figura 9. **Distribución de casos acumulados, estudios serológicos, reporte en animales (cerdo, caballo, vida silvestre y hospedadores sinantrópicos: perro, gato y rata) desde 1896 hasta 2016.** Adaptado y modificado de Ortega-Pierres *et al.*, 2000; Tay-Zavala *et al.*, 2004; Correa-Beltrán *et al.*, 1997; de la Rosa *et al.*, 1998; Arriaga-Díaz *et al.*, 1994; DGE SSA, 2016 S47.

Actualmente la infección está distribuida por toda la República Mexicana (figura 9) con el diagnóstico clínico y serológico se ha permitido observar la relación de casos acumulados desde 1990-2016 con las entidades de Hidalgo, Chihuahua , Veracruz, Jalisco, Oaxaca, Ciudad de México , Estado de México, Nayarit y Zacatecas (figura 10 y figura 11) presentando el mayor número de casos, los cuales se les atribuyó la infección por consumo de carne de cerdo, una de las causas de este suceso se debe a la costumbre de criar cerdos de traspatio que son alimentados con desperdicios de consumo humano o bien estos ingieren restos de carne de rata y otros animales silvestres, aunque no hay reportes provocados por consumo de carne de caballo (Reveles-Hernández *et al.*, 2011; de la Rosa *et al.*, 1998;DGE SSA 2016,S47 y S52).

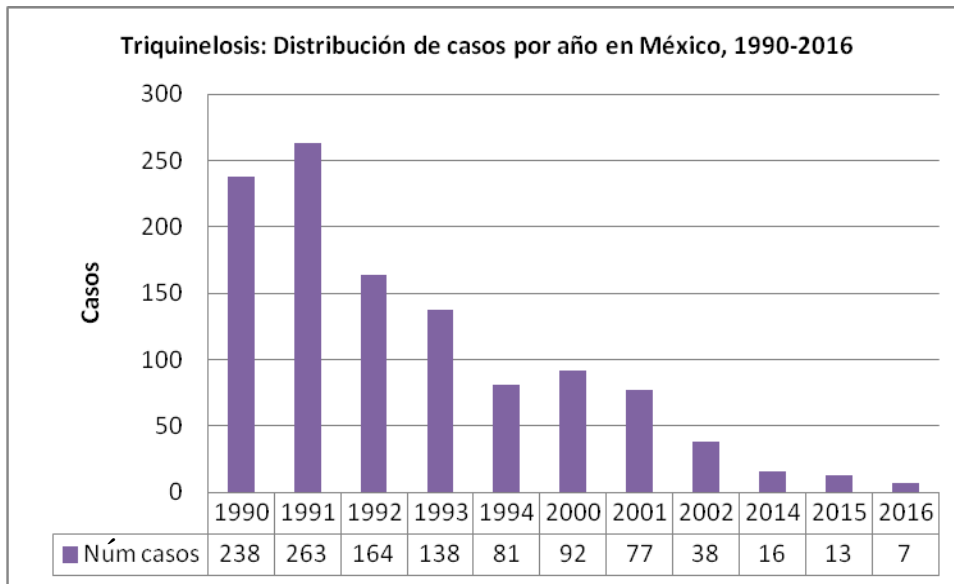


Figura 10. **Número de casos a nivel nacional de la triquinelosis humana (1990-2016).** Se observan los casos acumulados desde 1990 hasta el 2016 considerando la falta de reportes entre los años 1995-1999 y 2003-2013 (posiblemente ubicados en los reportes a otras helmintiasis) con una disminución a menos de 100 casos a partir del año 1994 hasta llegar a menos de 50 casos desde el año 2002 (Adaptado de los Boletines Epidemiológicos 2016.DGE, SSA Semana 47 / Semana 52).

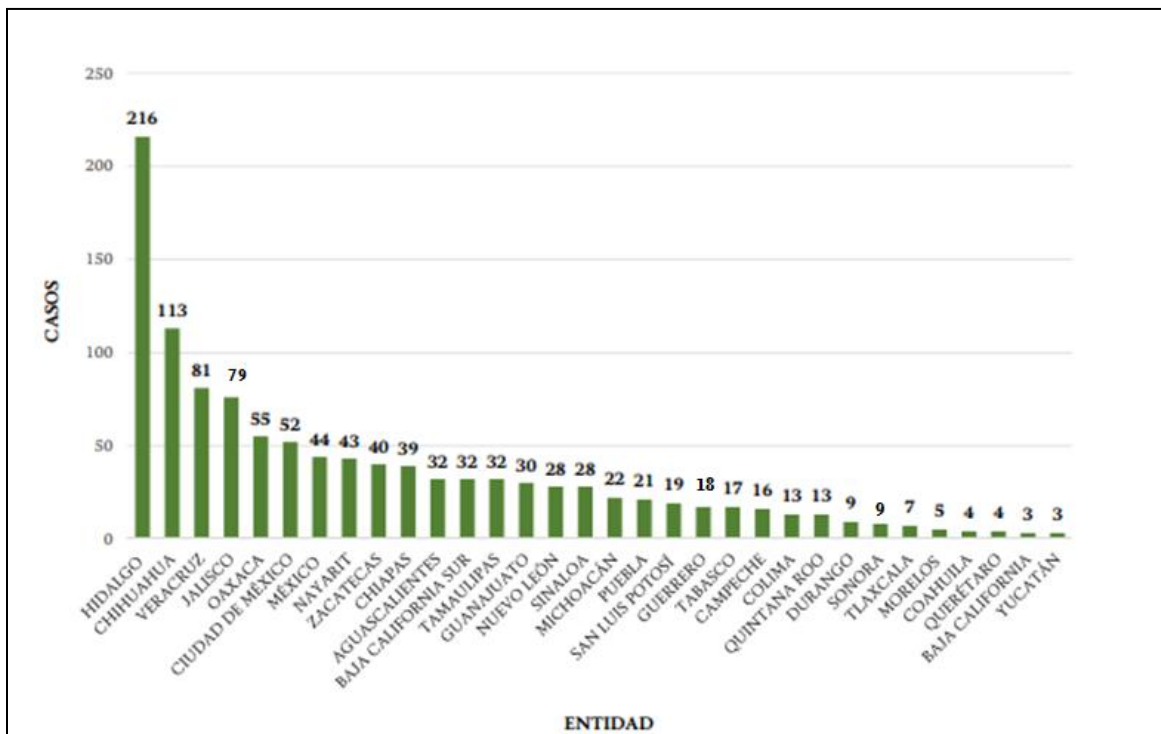


Figura 11. **Distribución total de casos de triquinelosis en México 1990-2016.** Se aprecia que los casos acumulados del estado de Hidalgo fueron más de 200, Chihuahua más de 100; Veracruz, Jalisco, Oaxaca y Ciudad de México más de 50. A partir del estado de México fueron menos de 50 casos llegando con solo 3 en Yucatán (Tomado de los Boletines Epidemiológicos 2016.DGE SSA Semana 47 / Semana 52).

Se debe tomar en cuenta que la relación de los casos a nivel nacional no está completa a pesar de emplear mejores métodos de diagnóstico ya que la confusión que puede presentarse al momento de evaluar un caso clínico asintomático puede estar dentro de los casos reportados en otras helmintiasis dado que estas sí se reportan anualmente, dejando con cierta incertidumbre los casos que se tienen por estado como lo son los mencionados en este proyecto. Las tres entidades federativas han presentado un número considerable de casos en donde Veracruz inició con 46 (1990) y finalizó con 9 (2002), Jalisco inicio con 14 (1990) pero tuvo su mayor cifra de 26 casos (1991) para cerrar con 4 (2016), por último el estado de México tuvo 5(1990); solo presentó 16 casos el año siguiente y finalizó con un caso en 2001(Cuadro 11).

Cuadro 11. Número de casos con sospecha clínica de triquinelosis humana en los Estados de México, Jalisco y Veracruz (1990-2016).

Entidad federativa	1990	1991	1992	1993	1994	2000	2001	2002	2014	2015	2016	Total
Edo. de México	5	16	7	8	4	3	1	0	0	0	0	44
Jalisco	14	26	7	13	2	0	7	3	3	0	4	79
Veracruz	46	5	0	12	0	9	0	9	0	0	0	81

Tomado y adaptado de los Boletines Epidemiológicos 2016 DGE SSA semana 47/semana 52.

1.11.2 Presentación en animales

1.11.2.1 Hospedadores domésticos

La mayoría de las especies, con la excepción de *T. spiralis* pueden parasitar animales salvajes, la causa entre la relación con la vida salvaje con los animales domésticos puede ocurrir cuando hay un manejo inadecuado de la segregación a las crías de vida silvestre por consiguiente se conocen tres tipos de ciclos los cuales pueden ser independientes o pueden interactuar, estos son conocidos como ciclo doméstico, peridoméstico y ciclo silvestre respectivamente (Campbell, 1988; Pozio, 2001; figura 12).

El ciclo doméstico y el peridoméstico tienen como eje al cerdo, principalmente por la ingestión de desechos que contiene fibras musculares de origen porcino. Es por esto que la incidencia en los cerdos es particularmente alta cuando se les alimenta con residuos de cocina, restaurantes y mataderos, o cuando se les mantiene libre al contacto con los basureros de las poblaciones (Flores-Amezquita, 2000). Se tiene como referencia que la prevalencia mundial en los cerdos no sobrepasa el 0.5% dado la inspección de las carnes además con la implementación de otros métodos aparte de la digestión como son las pruebas serológicas (ELISA, WB) y la biología molecular para el monitoreo de las granjas porcinas altamente industrializadas tanto en América y Europa, sin embargo la exposición a través de animales sinantrópicos que vivan en las cercanías de los cerdos como son las ratas, perros y gatos que es algo común en nuestro país con una variante como los mustélidos y zorros en Europa y Argentina han influido en la permanencia de la infección porcina (Fábregas y de Benito, 2001; Gamble y Bush, 1998; Ribicich *et al.*, 2009).

Se ha demostrado que los animales silvestres con la especie *T. spiralis* constituyen otro riesgo en la introducción y dispersión de la enfermedad en los cerdos dado que la interacción de estos en los microambientes así como la costumbre carroñera de los cerdos permite la permanencia de la enfermedad (Stojcevic *et al.*, 2004).

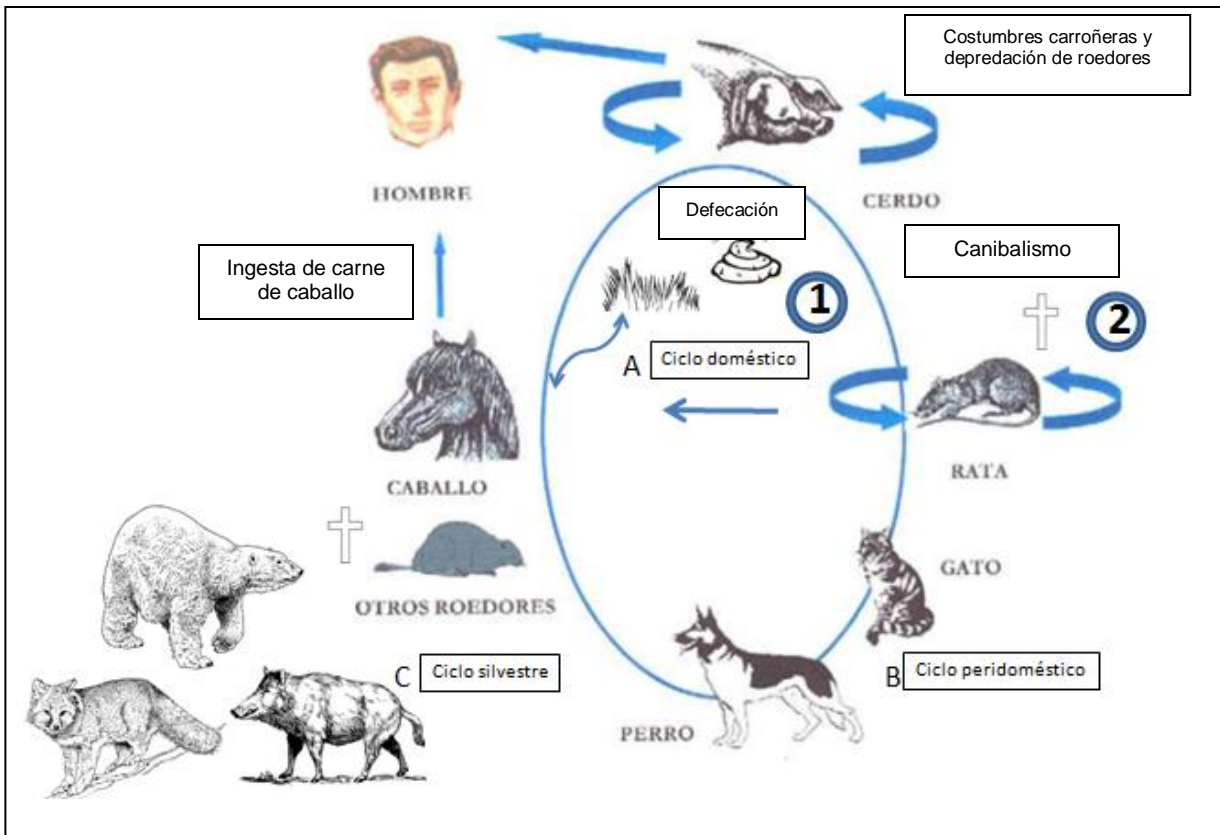


Figura 12. **Interacción entre los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre.** **A.**Ciclo doméstico en relación a la ingesta de carne cerdo-cerdo, cerdo-rata, caballo-cerdo y caballo-rata. **B.**Ciclo peridoméstico por animales cercanos a la vivienda de los cerdos (perro, gato y rata). **C.**Ciclo silvestre por la interacción de los cerdos con animales salvajes que también se consumen por el hombre (ejemplos comunes: zorro, oso y jabalí). Tomado y modificado de Martínez-Fernández, 1999.

México desarrolló varias investigaciones en cerdos para la búsqueda de larvas en su mayoría por los métodos directos con algunos trabajos mediante serología (cuadro 12), donde destacaron las entidades federativas (Estado de México, Zacatecas, Ciudad de México, Jalisco y Oaxaca) que reportaron cerdos infestados con un porcentaje de positividad del 4% o menos mientras que los estudios serológicos se ha podido observar desde el 5% al 12%, lo que ha hecho suponer que las infecciones en los mexicanos se dieran por una baja carga parasitaria mientras que los grandes brotes fueron por al menos un solo cerdo con gran número de larvas (Tay-Zavala *et al.*, 2004; Monroy *et al.*, 2001).

Cuadro 12. Investigaciones realizadas en cerdos de diversos estados de la República Mexicana para la búsqueda de larvas y seroprevalencia desde 1909-2006.

Año	# de cerdos	% positivos	Método diagnóstico	Lugar
1909-1913	472,031	0.25	Triquinoscopia	Cd. de México
1916-1920	318,235	1.05	Triquinoscopia	Cd. de México
1939	128,025	0.030	Triquinoscopia	Cd. de México
1943	120,208	0.07	Triquinoscopia	Cd. de México
1945	450	0.044	Digestión	Cd. de México
1951	3,000	0.73	Triquinoscopia	Edo de México
1953	5,000	0.6	Triquinoscopia	Cd. de México
1953	5,000	0.4	Triquinoscopia	Cd. de México
1962	300	0.67	Digestión	Cd. de México
1962	76,935	0.05	Triquinoscopia	Cd. de México
1962	300	0.66	Triquinoscopia	Cd. de México
1964	1,500	0.66	Triquinoscopia	Cd. de México
1971	313	0.32	Triquinoscopia	Jalisco
1974	1,000	4.2	Triquinoscopia	Jalisco
1976	341,204	0.001	Triquinoscopia	Cd. de México
1977	496,478	0.001	Triquinoscopia	Cd. de México
1977	2,228	0.94	Hemoaglutinación e inmunoelectroforesis	Cd. de México
1978	493,142	0.002	Triquinoscopia	Cd. de México
1979	306,442	0.005	Triquinoscopia	Cd. de México
1979	7,200	0.07	Digestión	Edo de México
1979	210	1.9	Triquinoscopia e histopatología	Jalisco
1980	272,355	0.005	Triquinoscopia	Cd. de México
1981	477,145	0.004	Triquinoscopia	Cd. de México
1982	410,607	0.003	Triquinoscopia	Cd. de México
1983	200	0	Digestión	Jalisco
1984	1,000	0	Digestión	Cd. de México
1985	434	0.91	Digestión	Jalisco
1986	546	0.9	Digestión	Jalisco
1991	50	6.0	Digestión	Edo de México
1991	250	0 2	Métodos directos ELISA	Edo de México
1992	8,000	1.25	Digestión	Edo de México
1992	600	0.33 1.33	Triquinoscopia Digestión	Zacatecas
1993	2,150	0.09 0.33	Triquinoscopia Digestión	Oaxaca
1993-1994	151,908	0.001	Triquinoscopia	Edo de México
2001	539	0 11.7 12.4	Digestión ELISA WB	Edo de México
2006	950	0.39 5	Triquinoscopia Serología	Zacatecas

Tomado y modificado de Tay-Zavala *et al.*, 2004; Salazar-Gutiérrez, 1985; Monroy *et al.*, 2001; Cervantes-Vázquez, 1993; Chávez-Guajardo *et al.*, 2006.

En el caso del caballo aun no es claro cómo puede adquirir la infección debido a que es un animal herbívoro con un sistema digestivo delicado en cuanto al consumo de alimentos que pueden generarle problemas como son cólicos abdominales y obstrucción intestinal (Kellam *et al.*,2000).

Las teorías de infección que se han propuesto son las siguientes, las cuales no han sido comprobadas (se incluyen en la figura 12 inciso A. Interacción entre los ciclos doméstico, peridoméstico y silvestre):

- Alimentarse en praderas contaminadas con heces de cerdos o animales salvajes infectados.
- Por alimentarse con pasturas contaminadas con restos de carne de roedores, cerdos y otros animales carnívoros silvestres infectados con *Trichinella*.

Se sabe que la transmisión de la Habronemosis por los nematodos *Habronema muscae* y *Draschia megastoma* en équidos a través de las moscas domésticas, actúan como hospedadores intermediarios y la infestación es por vía oral o por vía cutánea. Suponiendo que la carga de larvas en moscas carroñeras es lo suficiente para desarrollar la infección, se podría considerar como alternativa en el género *Trichinella*, sin embargo no hay estudios referentes a esto (Quiroz-Romero, 2005) . Con todos estos elementos se refuerza el hecho de tener que mejorar los controles de calidad al momento de inspeccionar la carne de caballo en los rastros (Pozio *et al.*, 1997).

Debido a los contados brotes por consumo de carne de caballo no se ha considerado como fuente de transmisión de *Trichinella* al hombre. Sin embargo el trabajo de Yopez-Mulia y Ortega-Pierres (1994) refieren a la triquinelosis equina por primera vez y la necesidad de tener herramientas de diagnóstico en los rastros para la identificación de caballos infestados, debido al brote ocurrido en Francia en ese mismo año, donde se presentaron siete casos de triquinelosis

humana y se vinculó por el consumo de carne de caballo procedente de México. Se cree que algunos de estos equinos pudieron tener cargas parasitarias bajas por lo cual no se detectaron mediante los métodos directos establecidos en los rastros, hasta el momento se tiene como referencia que la prevalencia de caballos infectados es del 0.001% (Dupouy *et al.*, 1994; Boireau *et al.*, 2000; Pozio y Zarlenga, 2005).

Con respecto al tejido de importancia donde se aloja *T. spiralis* se ha visto que la presencia de las LM (figura 13) son: lengua, maseteros, músculo trapecio, diafragma y músculo supraespinoso, hay que aclarar que la invasión de las LM es en todo el tejido muscular (Arriaga-Díaz *et al.*, 1995). El número de LM en *T. murelli* disminuye alrededor de las 20 a 40 semanas p.i., mientras que en *T. spiralis* sucede después de las 52 semanas p.i. sugiriéndose la susceptibilidad del caballo a la especie *T. spiralis* (Soulé *et al.*, 1989).

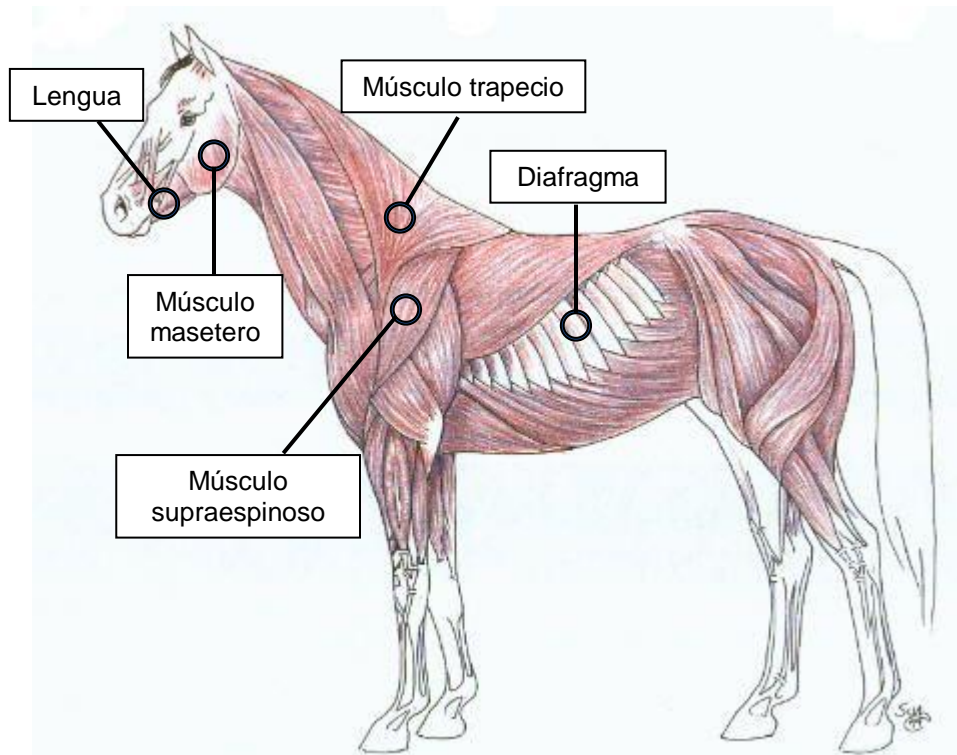


Figura 13. **Esquema de los sitios de preferencia de la LM en músculo del caballo.** Se señala mediante un círculo los tejidos en cabeza (lengua y maseteros), torso (músculo trapecio y diafragma) y extremidades (músculo supraespinoso). Tomado y modificado de lomania.hupont.hu/69/testfelepites.

Se tiene registro de manera experimental sobre la reproducción de la infección en caballos, demostrando que son susceptibles a la infección con diferentes especies del género *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni* y *T5*); donde *T. spiralis* fue la más infectiva, siendo utilizadas entre 5 hasta 70 mil LM para producir la infección, y cabe mencionar que durante dicha infección no se observaron signos clínicos aparentes (Arriaga-Díaz *et al.*, 1996; Pozio *et al.*, 1997; Pozio *et al.*, 1999). Los estudios serológicos (ELISA, Western blot y Inmunofluorescencia Indirecta) mostraron anticuerpos específicos hasta las 3-6 semanas p.i. y disminuyeron después de las 20 semanas p.i. incluso con dosis altas de 50,000 LM no se detectaron anticuerpos después de las 25 semanas p.i. (Soulé *et al.*, 1993; Yépez-Mulia *et al.*, 1999) lo cual indicaba que los métodos indirectos no podían usarse de manera rutinaria para certificar carne de caballo libre de *Trichinella* dada la dependencia de los niveles de anticuerpos con la carga parasitaria y la eosinofilia fue variable entre los animales estudiados (Boireau *et al.*, 2000).

Los países que desarrollaron proyectos enfocados a la prevalencia y localización de caballos infectados son: Francia, Italia, Polonia, Suiza, Bélgica, Rumania, Serbia, Finlandia, Islandia, Grecia, EEUU, Canadá (cuadro 14) y México (cuadros 13), la gran mayoría empleando como prueba básica la digestión, complementándole mediante pruebas serológicas como el ELISA y el WB hasta la biología molecular con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Cuadro 13. Frecuencia de positividad en caballos infectados por *Trichinella spiralis* en México mediante técnicas de digestión, serología y biología molecular.

País México (Localidad)	# caballos (obtención)	Año	Método	Frecuencia + (%)	Referencias
EdoMéx	80(Mpal.)	1995	Digestión	4/80(5)	Arriaga <i>et al.</i> , 1995.
EdoMéx	147(Mpal.) 4 (Exp.)	1999	ELISA	10/147(7)	Yepez-Mulia <i>et al.</i> , 1999.
			WB (en 13/151)	8/13	
EdoMéx	80(Mpal) 90(TIF *2 SLP.11 VER)	2001	Digestión	0/80 y 0/90	Viveros <i>et al.</i> , 2001.
			ELISA	14/80(17) y 6/90 (7)	
			PCR	11/80(14) y 2/90(2)	
EdoMéx	70(TIF.) 80(Mpal.)	2005	Digestión	1/70(1.42) y 1/80 (1.25)	Jimenez <i>et al.</i> ,2005
			PCR	3/70(4.28) y 3/80(3.75)	
EdoMéx	100(Mpal.) 100(TIF) *2 SLP 11 VER	2007	Digestión	0/100 ambos rastros	Uribe-Gutiérrez.2007
			PCR	22/100 (22) y 11/100(11)	
			PCR múltiple	0	

Abreviaturas: Rastros: Mpal. (Municipal) y TIF (Tipo inspección Federal), SLP (San Luis Potosí) y VER (Veracruz). Empleo de muestras ya trabajadas en PCR de punto final (*)

Cuadro 14. Frecuencia de positividad en caballos infectados por *Trichinella spiralis* de diferentes países mediante técnicas de digestión, serología y biología molecular.

País	# caballos (obtención)	Año	Método	Frecuencia + (%)	Referencias
Francia	59,600 (TIF)	1996-1999	Digestión	2 (0.07/1000)	Boireau (Rpte. pers.)
Polonia	13,523 (TIF)	1994	Digestión	0	Ramisz and Balicka, 1994
			ELISA	72 (0.53)	
Polonia	500,000(TIF)	1984-1994	Digestión	0	
Bélgica	1,577 (TIF)	1986-1991	Digestión	0	Borchgrave et al., 1991
	40,164 (TIF)	1997-1998			Geerts (Rpte. Pers.)
Italia	600,000 (TIF)	1996-1999	Digestión	3 (Muy bajo)	Celano et al., 1996; Pozio et al., 1999
Suiza	106 (TIF)	1993	Digestión ELISA	0	Jakob et al., 1994
EEUU	60,696 (TIF)	1996-1999	Digestión	0	Gamble (Rpte. Pers.)
Canadá	315,000 (TIF)	1995-1999	Digestión	0	Gajadhar (Rpte. Pers.)
Rumania	5,267 (TIF)	2001	WB	185(3.5)	Sofronic-Milosavljevic et al., 2001
			ELISA	0	
Rumania	3000 (TIF)	2001	ELISA	0	Blaga et al., 2009
	2992 (TIF)	2002		0.56	
Finlandia	30,282 (TIF)	1990-2003	Digestión	0	Ovaine, 2005
Serbia	39 (Mpal.)	2004	IFA	1/39(2.5)	Murrell et al., 2004
			ELISA	2/39(3.6)	
Polonia	2/18 (Exn a Italia)	2008	PCR	Infección mixta: 80 <i>T. britovi</i> 20 <i>T. spiralis</i>	Liciardi et al., 2009
Islandia	1,600 (TIF)	1998-2008	Digestión	0	Skírnisson et al., 2010
Grecia	773 (TIF)	2007-2008	ELISA	1(0.1)	Kouam et al., 2010

Tomado y modificado de Boireau *et al.*, 2000. Abreviaturas: Rastro Mpal. (Municipal) y TIF (Tipo inspección Federal).

Desde 1984 - 2008 la mayoría de reportes que se realizaron mediante digestión artificial con una prevalencia de 0.0 - 0.7% con un intervalo de 1600 - 600,000 animales muestreados en todos los países mencionados excepto en México donde Arriaga-Díaz *et al.* (1995) obtuvieron una prevalencia del 5% a partir de 80 caballos.

Aun con las consideraciones mencionadas sobre la presencia de anticuerpos en estos animales, se evaluaron muestras de suero, México utilizó caballos de un rastro TIF del Estado de México y Rumania utilizó caballos que llegaron de la inspección de carne en Italia revisada entre 1996-2001 mediante las técnicas de

ELISA y Western blot donde su frecuencia de positividad se encontró en un intervalo de 0.53 – 7% (ELISA) y 3.5 al 7% (WB). Yepez-Mulia (1999) empleó 147 muestras de suero con las condiciones de dilución para ELISA (suero 1:400, conjugado anti caballo IgG 1:10,000) y WB (suero 1:100 , conjugado anti caballo IgG 1:3000) , mientras Sofronic-Milosavljevic *et al.*, (2001) con 5,267 muestras de suero a una dilución de 1:50, utilizó dos conjugados Proteína A y Proteína G que se pudo apreciar un mejor reconocimiento de las bandas de 45,49 y 55 kDa con el segundo conjugado.

Viveros *et al.*, (2001) plantearon en México otra estrategia a partir de lo visto previamente por Yepez-Mulia (1999), incluyendo la PCR en vez del WB e incrementando el número de caballos muestreados provenientes de dos rastros del Estado de México, uno municipal(aquel que no esta certificado) y otro federal (con certificación TIF) siendo 170 muestras de las cuales se identificó la procedencia de 13 (2 de San Luis Potosí y 11 de Veracruz) y el resto se siguieron las condiciones del ELISA mencionadas por Yepez-Mulia *et al.*,(1999) con la diferencia de emplear una dilución de suero a 1:20 y comparó los resultados con digestión artificial, ELISA y PCR sencillo. La digestión no tuvo presencia de LM, el ELISA tuvo una frecuencia de positividad del 17% (rastro municipal) y 7% (rastro federal); por último la condición para obtener un resultado positivo en la PCR fue por la amplificación de las bandas de 600 a 800 pb (pares de bases) en las muestras de tejido equino con una prevalencia del 15 y 2% respectivamente, tomando en cuenta que las muestras de San Luis Potosí y Veracruz fueron positivas en la PCR. Tiempo después el trabajo de Jiménez-Cardoso *et al.*, (2005) empleó solamente la digestión y el PCR con 150 muestras de caballo provenientes de dos rastros rural y federal, la presencia de larvas fue en su mayoría de los maseteros con una frecuencia de 1.42% en el rastro rural mientras el rastro federal obtuvo 1.25%, la PCR fue 4.28 (rastro municipal) y 3.75% (rastro federal).

Uribe-Gutiérrez (2007) implementó mediante digestión, PCR y PCR múltiple la evaluación de 200 caballos de dos rastros (5 de Junio y Río Frío) del Estado de México y las mismas muestras que utilizó Jiménez-Cardoso (3 de San Luis Potosí y 12 de Veracruz) para observar si había variabilidad genética al usar otro tipo de marcadores, el resultado fue negativo para la digestión y entre 11 a 22% de positivos en PCR sencilla pero negativo en la PCR múltiple donde explica que este último se ha realizado con DNA de LM purificadas y no con tejido de animales infectados ya que al parecer el tejido muscular del caballo resta sensibilidad al ensayo, siendo algunos factores como la interacción entre los iniciadores dado que emplea más de dos como en un PCR sencillo o bien por la concentración limitada de enzima y nucleótidos al momento de realizar la reacción de amplificación (Uribe-Gutiérrez, 2007).

1.11.2.2 Hospedadores sinantrópicos

La asociación de los roedores principalmente la rata con la epidemiología de diferentes patógenos, de los cuales actúan como reservorios, se ve favorecido porque constituye el grupo más numeroso dentro de los mamíferos y por su capacidad de colonizar exitosamente todos los hábitat utilizados por el hombre (Moreno-García *et al.*, 2007), ya que se extiende por ejemplo a granjas de cerdos y vertederos de basura. Dicho papel fue propuesto en el siglo XIX por Leuckart como la “teoría de las ratas”, por otra parte Zenker (1871) sugirió que la infección en cerdos es más un marcador de la infección en estos debido a que la fuente de infección de ambos animales eran los desperdicios y restos de cadáveres de cerdo (Pozio y Zarlenga, 2005).

La situación establecida para el ciclo peridoméstico (figura 12 inciso B) donde intervienen perros y gatos puede ser no solo por el consumo de desechos alimenticios del hombre sino que pueden alimentarse de carne de otros animales como son los roedores ya sea por encontrarse en vía pública o en basureros (Berumen *et al.*, 2002).

En las ratas alrededor de granjas peleteras se han comprobado infestaciones de hasta el 75%, aunque lo reportado en carnicerías y restaurantes americanos ha llegado a ser entre 0.7 al 7.8%, mientras lo reportado por Moreno-García *et al.* (2007) en un basurero municipal del estado de Zacatecas arrojó una prevalencia del 3%. Por lo tanto el impacto epidemiológico de la rata para mantener la infección entre los cerdos (inadecuadamente alimentados) y los hospedadores sinantrópicos (perro y gato) ha dependido del sistema de control ante plagas mediante pesticidas, los cuales vuelven a las ratas presas fáciles para su consumo, aunque la relación de prevalencia de ratas infestadas no llega a sobrepasar el 0.9% y en los gatos alrededor del 15% (Cervantes-Vázquez, 1993; Barr-Richarson, 2006; Dupouy *et al.*, 2007).

En perros por otra parte han llegado a observarse prevalencias entre el 4.3 al 8.7% en poblaciones caninas de Europa mientras que en México lo último reportado fue por Berumen *et al.* (2002) con una prevalencia del 5.82% estando este resultado en la media ante el intervalo mencionado y solo se ha llegado a un valor alto en 1975 con 37,000 perros evaluados mediante digestión y pruebas serológicas donde el 21% provenían de China, hay que destacar que este animal ha provocado brotes en humanos precisamente en China al igual que Korea, Tailandia, Suiza, Eslovaquia y Rusia (Gómez-Morales *et al.*, 2016).

1.11.2.3 Hospedadores de vida silvestre.

El desarrollo del ciclo silvestre (figura 12 inciso C) está ligado con el predominio a la depredación, canibalismo y costumbres carroñeras por parte de las especies carnívoras y omnívoras pero el ser humano puede influir en este comportamiento debido al uso de carne infestada empleada para atraer a los animales en la cacería, tomando en cuenta que la distribución de todas las especies asociadas al ciclo silvestre se encuentran en regiones templadas y tropicales y en las regiones árticas y subárticas no sobrevive en una canal congelada. La interacción de los animales silvestres se presenta cuando el hombre o el cerdo ingieren carne de estos de manera cotidiana como se ha visto

en grandes brotes provocados por consumo de carne de jabalí debida a la alta demanda por el crecimiento de la población humana como consecuencia ha generado una relación de casos del 55% recientemente en Europa, Asia y Norte y Sur de América (Meng *et al.*, 2009; Pozio, 2015). Por otro lado la ingesta de carne de oso ha tenido un impacto en el hombre de por lo menos el 5% de brotes humanos dado la caza de oso negro, grizzli y polar por la cacería en Norteamérica y Alaska (Bruschi y Dupouy, 2014).

Y por último el consumo de la carne proveniente de los hospedadores silvestres por parte del hombre solo ha llegado a impactar en un 1% a nivel mundial, siendo principalmente países como Estados Unidos, Rusia, Korea, Canadá, Taiwan, Senegal y Algeria al consumir carne de morsa, tejón, puma, chacal y tortuga (Jeong *et al.*, 2015).

1.12 Situación actual de la producción cárnica equina

El caballo se ha faenado a partir de animales de descarte, generalmente deportivos o de carga al final de su vida productiva, o animales con problemas de salud, siendo el de carga exportado a otros países (Fabregas, 2002).

El empleo de la carne de caballo tanto en México como el resto de América Latina ha sido como alimento para animales domésticos o bien para animales carnívoros en cautiverio. Sin embargo se ha descrito la elaboración de diferentes embutidos como: chorizo, longaniza, jamón y carne para hamburguesas (Almaraz *et al.*, 1995). Por tal motivo el consumo de esta carne se ha incrementado en los últimos años, principalmente en el abasto por su bajo costo y beneficios en relación con la carne de res (Almaraz *et al.*, 1995; Arriaga-Díaz *et al.* 1996; Ortega-Pierres *et al.* 2000).

Los países con mayor consumo de carne de caballo son Francia e Italia siendo este último el mayor consumidor con 1.3 Kg/persona/año, representando así su consumo en la población de un 11%. Debido a la aparición de la encefalitis

espongiforme bovina (BSE) en la década de los 90's, la carne de caballo intervino en la producción a nivel nacional de Italia por lo cual se incremento en un 38% la importación entre los años 2000 a 2001, mientras que Francia fue considerado un país que podía sustentar la demanda interna de carne de caballo en un 32% dejando así el resto al proveedores externos como fue Polonia a finales de los 90's (Catelli, 2004).

Se sabe que la producción mundial de carne equina hasta el periodo de 1993-2014 ascendió a 738,073.55 toneladas limpias, de las cuales el 41% fue del continente Asiático, 31% América, 22.5% Europa, 3.4% Oceanía y solo el 2% de África. Los diez principales productores son China, México, Kazajstán, Rusia, Argentina, Italia, Mongolia, Estados Unidos, Australia y Canadá (figura 14A), siendo nuestro país el segundo con una producción de 81,768.55 toneladas que equivalen al 11.07% (Faostat, 2015).

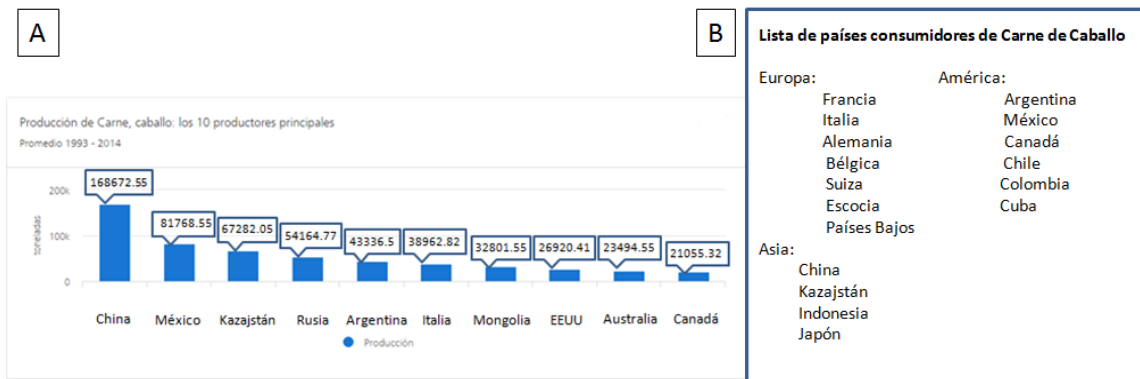


Figura 14. **Producción de los 10 principales productores de carne de caballo a nivel internacional y sus principales consumidores.** **A.** Gráfico de toneladas promedio acumuladas por los 10 productores de carne de caballo, donde México ocupa el segundo puesto con 81.768.55 toneladas. **B.** Lista de los países consumidores de carne de caballo donde figuran los tres primeros países de cada continente Francia, Italia y Alemania (Europa); Argentina, México y Canadá (América) y China, Kazajstán e Indonesia (Asia). Tomado y modificado de <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QL/visualize>.

La producción de carne de caballo en distintos países de Europa se ha presentado como una alternativa más, dentro de las carnes de abasto y uso de espacio a diferencia de otras especies. El consumo de esta carne en el mundo (figura 14B) está centrado en algunos países de Europa; principalmente Francia, Italia, Países Bajos, Bélgica y fuera de Europa la demanda está presente en Japón, Chile, Colombia y Cuba como una alternativa válida para la alimentación, con cortes semejantes al del vacuno tanto como carne fresca o manufacturada (Catelli, 2004; Corradi *et al.*, 2005; SAGARPA, 2007). En México la producción para carne como actividad primaria o secundaria no existe y no se cuenta con un padrón de productores de équidos ex profeso para producir carne de équido para consumo humano pero en caso de requerir para materia prima se recurre a la importación de ganado equino de los Estados Unidos (SAGARPA,2012).

2. Justificación

La triquinelosis es una zoonosis epidémica de origen alimentario y de distribución mundial. La triquinelosis se transmite por el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida que alberga a la LM. En México y en muchos otros países la principal fuente de infección es la carne de cerdo; sin embargo, no se descarta el consumo de jabalí, oso y cualquier otro animal que se considere como producto de caza. En muchos países europeos el consumo de carne de caballo se hace de manera regular y la carne de origen latinoamericano es apreciada, particularmente la que se exporta de México. Aunque existen normas y rastros con reglamentación para la inspección y exportación de carne de caballo libre de patógenos, aún se desconoce cuál es la prevalencia y distribución de *Trichinella* en los equinos mexicanos. La mayoría de los equinos, se usan primero como animales de trabajo y al final de su vida productiva se destinan a otros fines como carne de consumo y sus derivados para animales y seres humanos. Se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de este parásito, tomando como punto de partida los rastros tecnificados y de traspatio existentes en el Estado de México, la mayoría de los reportes indican una prevalencia menor al 5%.

En otros países (Francia, Italia, Argentina, Rusia, Rumania, Croacia, China, Lituania y Serbia) la prevalencia de triquinosis equina es de menos del 0.001%.

La triquinoscopia y la digestión artificial son las técnicas de elección para obtener los datos de prevalencia; sin embargo, su utilidad diagnóstica se ve limitada por su capacidad de detección de 1 LM por cada 10 g de carne, lo cual quiere decir que cargas parasitarias menores no son detectables. Estas técnicas tampoco son capaces de detectar parasitosis con menos de un mes de infección. La determinación de anticuerpos ha demostrado ser una herramienta útil en estudios epidemiológicos debido a la versatilidad de las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA, IFI, WB) y a la confiabilidad de los productos de excreción y secreción de la LM que se utilizan como antígeno. Por WB, los sueros de pacientes y animales infectados reconocen un triplete de 45, 49 y 55 kDa, que se reconoce como criterio diagnóstico.

De esta manera, en este trabajo se buscaron anticuerpos contra *Trichinella* en sueros de caballos obtenidos de tres rastros de concentración ubicados en los Estados de México, Jalisco y Veracruz. Adicionalmente, conociendo las limitaciones del WB en cuanto a tiempo y proceso de ejecución, se evaluó la capacidad diagnóstica de un Dot-ELISA.

3. Objetivo

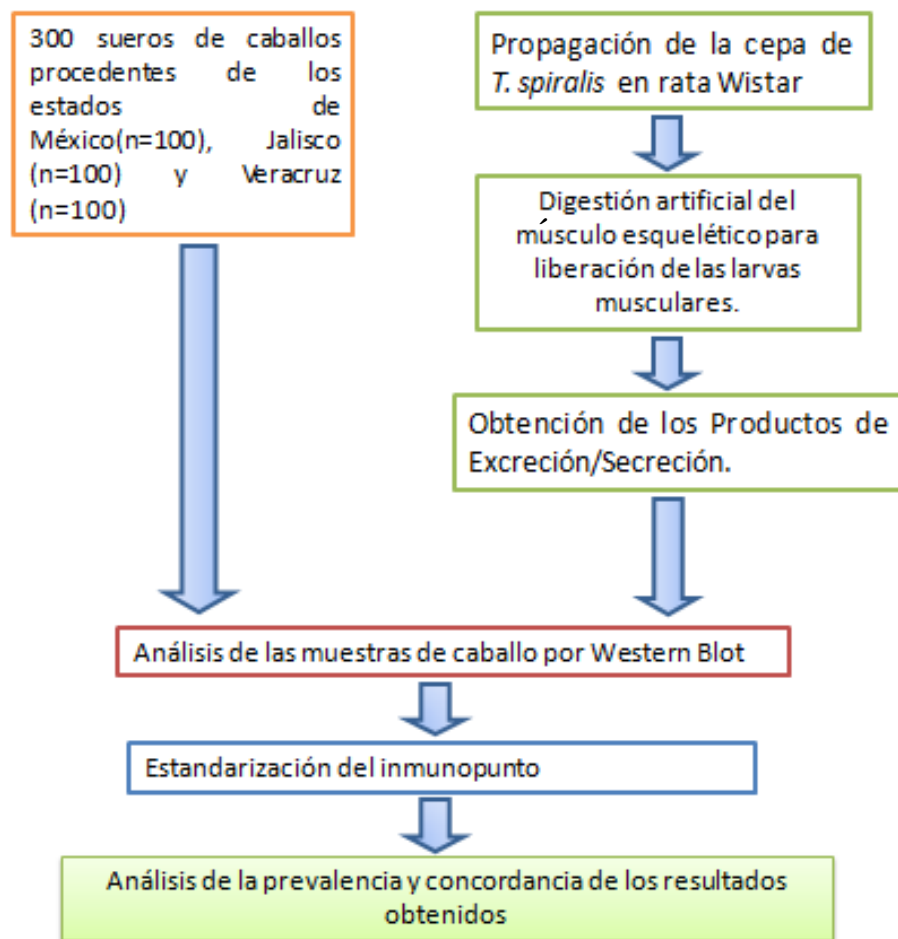
Determinar la presencia de anticuerpos contra los productos de excreción y secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis* en caballos faenados en tres rastros municipales de los Estados de México, Veracruz y Jalisco.

3.1 Objetivos particulares

1. Obtener larvas musculares de *Trichinella spiralis* a partir de ratas de la cepa Wistar infestadas experimentalmente y preparar los productos de excreción y secreción.

2. Seleccionar 300 muestras de suero de caballo del banco de sueros del laboratorio de Inmunoparasitología del InDRE. Se seleccionaron 100 muestras por rastro, (Estado de México, Jalisco y Veracruz).
3. Determinar la presencia de anticuerpos contra *Trichinella* en las muestras de suero de equino por inmunoelectrotransferencia.
4. Instrumentar un Dot-ELISA y determinar la presencia de anticuerpos contra *Trichinella* en el suero de caballo.
5. Determinar el valor diagnóstico del Dot-ELISA con respecto a la inmunoelectrotransferencia.

4. Diseño experimental



5. Materiales y métodos

5.1 Material Biológico

5.1.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratas Wistar de ambos sexos de 6 semanas de edad, libres de patógenos para mantenimiento de la cepa y obtención de larvas musculares necesarios para los productos de excreción y secreción.

5.1.2 Parásito

Se utilizó la cepa MSUS/MEX/91/CM-9 de *Trichinella spiralis*, mantenida en ratas Wistar en el bioterio del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (InDRE) de la Secretaría de Salud.

5.1.3 Muestras

Se evaluaron 300 muestras de sueros de caballos distribuidas en 100 muestras por estado de la república (Estado de México, Jalisco y Veracruz), obtenidas por oportunidad en los rastros y almacenadas en el banco de muestras del Laboratorio de Inmunoparasitología del InDRE.

Además, para la implementación del inmunopunto, se emplearon muestras séricas hiperinmunes contra *Trichinella* obtenidas en rata, ratón y cerdo. Las muestras también fueron provenientes del mismo banco de muestras.

5.2 Reactivos y equipos por inmunoensayo

5.2.1 Propagación de cepa, obtención y conservación de Productos de Excreción/ Secreción

- Anestésico inyectable de uso veterinario Zoletil 50 con Tiletamina 25mg y Zolacepam 25mg (Virbac, Colombia).
- Solución de pepsina (Sigma-Aldrich, EEUU) de mucosa gástrica de cerdo al 1%
- Ácido clorhídrico concentrado (Merck; Darmstadt, Alemania).
- Solución amortiguadora de fosfatos (siglas en inglés PBS) 0.01M a pH 7.2.
- Soluciones de dextrosa (J.T. Baker, México) para gradiente trifásico (20, 40 y 80%).
- Solución medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EEUU). Solutos: nitrato de calcio 4·H₂O (0.1g/L), sulfato de magnesio anhidro (0.048g/L), cloruro de potasio (0.4g/L), bicarbonato de sodio (2g/L), cloruro de sodio (6g/L) y fosfato de sodio dibásico anhidro (0.8g/L); adicionado con 100U/mL de Penicilina (Gibco; Naucalpan, México) y 100µg/mL de Estreptomicina (Agrovet; Los Reyes Acaquilpan, México).
- Caja de cultivo de 50 mL (Corning; New York, EEUU).
- Solución de N-alfa-tosil-lisina-clorometilcetona (TLCK) a 1mg/mL. (Sigma-Aldrich; St. Louis, EEUU).
- Solución de N-tosil-L-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK) a 1mg/mL. (Sigma-Aldrich; Manheim, Alemania).
- Solución de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) al 0.06% (Sigma-Aldrich; Toluca, México).
- Solución de sal sódica de p-hidroximercuribenzoato (PHMB) al 0.04% (Sigma-Aldrich; Toluca, México).
- Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 M. (Invitrogen, EEUU).
- Parrilla eléctrica con agitación magnética (Thermo Scientific, modelo SP131325).
- Centrifuga clínica rango de velocidad 500 a 5000 rpm.
- Microscopio de campo claro con aumentos de 10 a 100x.
- Picadora de carne (Mulinex, modelo Type643)

- Estufa de incubación rango de temperatura +5° a 75°C.
- Cabina de bioseguridad (Lab Conco, modelo Logic class II).

5.2.2 Cuantificación de productos de excreción/secreción

- Agua bidestilada.
- Reactivo de Bradford (Bio-rad, EEUU).
- Placa de 96 pozos de fondo plano (Costar Corning; New York, EEUU)
- Estándar de Albúmina suero bovino Albúmina fracción V concentración de 2.0mg/mL en 0.9% de solución salina (Pierce; Rockford Illinois, EEUU).
- Lector de microplacas para absorbancia (Tecan, modelo Sunrise).

5.2.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

- Agua bidestilada.
- Solución de acrilamida/bis-acrilamida (acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%).
- Solución amortiguadora de gel separador Tris-Base 2M a pH 8.8
- Solución amortiguadora de gel concentrador Tris-HCl 0.5M a pH 6.8
- Solución de Lauril sulfato sulfato de sodio (SDS) al 10%
- Solución de Persulfato de amonio al 10%
- Reactivo N,N,N´N´-tetrametiletildiamina (TEMED) al 99%
- Solución amortiguadora de electroforesis de Tris-Glicina 5x y SDS al 10%, pH 8.3
- Solución de Azul de bromofenol al 0.05%
- Reactivo 2 mercaptoetanol al 98% (Sigma, EEUU).
- Solución de Azul de Coomasie al 0.06%
- Solución decolorante (metanol-acético-agua)
- Equipo de electroforesis para mini geles (Bio-rad, modelo mini Protean II).
- Proteínas estándar conocidas: β -Galactosidasa (116 kDa), Albúmina sérica bovina (66kDa), Albúmina de huevo (45kDa) y Anhidrasa carbónica (29 kDa). (Sigma; St. Louis, EEUU).

- Fuente de poder (Bio-rad, modelo 200/2.0 Power Suply).

5.2.4 Método de inmunoelectrotransferencia o Western blot

- Agua bidestilada.
- Solución de acrilamida/bis-acrilamida (acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0.8%).
- Solución amortiguadora de gel separador Tris-Base 2M a pH 8.8
- Solución amortiguadora de gel concentrador Tris-HCl 0.5M a pH 6.8
- Solución de Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%
- Solución de Persulfato de amonio al 10%
- Reactivo N,N,N´N´-tetrametiletilendiamina (TEMED) al 99%
- Solución amortiguadora de electroforesis Tris-Glicina 5x y SDS al 10%, pH 8.3
- Solución de Azul de bromofenol al 0.05%
- Reactivo 2 mercaptoetanol al 98% (Sigma, EEUU).
- Equipo de electroforesis para mini geles (Bio-rad, modelo mini Protean II).
- Solución amortiguadora de Transferencia Tris 0.025M, Glicina 0.125M, pH 8.3 Metanol al 20%
- Proteínas estándar conocidas: β -Galactosidasa (116 kDa), Albúmina sérica bovina (66kDa), Albúmina de huevo (45kDa) y Anhidrasa carbónica (29 kDa). (Sigma; St. Louis, EEUU).
- Fuente de poder (Bio-rad, modelo 200/2.0 Power Suply).
- Solución de Rojo de Ponceau al 0.2%
- Solución de leche descremada al 2.5%
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M con Tween 20 (siglas en inglés PBS-Tween) al 0.3%.
- Reactivo Conjugado Proteína A peroxidasa a 2mg/mL (GeneTex, EEUU).
- Solución de sustrato de diaminobencidina 7.5mg/mL con peróxido de hidrógeno al 30%
- Equipo para transferencia (Bio-rad, modelo mini trans blot cell).

- Membrana de nitrocelulosa de poro 0.2µm (Schleicher & Schuell, EEUU).
- Agitador orbital de placas (Thermo Scientific, modelo Max Q4310).

5.2.5 Técnica de Inmunopunto o Dot-ELISA

- Solución de leche descremada al 2.5%.
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.01M con Tween 20 (siglas en inglés PBS-Tween) al 0.3%.
- Conjugado Proteína A peroxidasa a 2mg/mL (GeneTex, EEUU).
- Conjugado Anti Cerdo peroxidasa a 2mg/mL (Sigma-Aldrich, EEUU).
- Conjugado anti Rata peroxidasa a 2mg/mL (Sigma-Aldrich, EEUU).
- Solución de sustrato de diaminobencidina 7.5mg/mL con peróxido de hidrógeno al 30%
- Agua bidestilada.
- Estufa de incubación rango de temperatura +5° a 75°C.
- Placa de 24 pozos con fondo plano (Corning; New York, EEUU)
- Agitador orbital de placas (Thermo Scientific, modelo Max Q4310).
- Membrana de nitrocelulosa de poro 0.2µm (Schleicher & Schuell, EEUU).

5.3 Propagación de la cepa de *Trichinella spiralis*

La cepa MSUS/MEX/91/CM-9 de *Trichinella spiralis* se propagó en ratas de la cepa Wistar. Las ratas se emplearon cuando estaban infectadas con al menos 30 días. Para propagar la cepa, a cada rata se le administraron 25 LM por gramo de peso corporal por vía oral. Para obtener las LM (figura 15), a cada rata infestada se le administró una dosis de 2mg/kg de peso del anestésico Zoletil 50 (Virbac, Colombia) por vía intramuscular para producir la eutanasia en el animal. Posteriormente se realizó la necropsia retirando extremidades, cabeza, piel, remoción de vísceras y grasa (evisceración) solo se conservó el músculo del canal, diafragma, maceteros y lengua (figuras 15.1 y 15.2). Con el tejido muscular del diafragma se realizó una observación al microscopio como se

describe en la sección 1.8.1 del diagnóstico directo para evidenciar la presencia de las larvas encapsuladas en el músculo (figura 15.3).

Toda la carne, incluida las muestras para observación al microscopio, fueron trituradas en una picadora de carne (Mulinex, Type643) y se colocó en una solución de ácido clorhídrico más pepsina gástrica de mucosa de cerdo al 1%(jugo gástrico) en una proporción de 100 mL de solución por 10 g de carne picada, durante 4 horas a 37°C en agitación constante, permitiendo la disgregación de la carne y la liberación de las larvas musculares (figuras 15.4 y 15.5).

Al finalizar la digestión artificial se montó el sistema de recuperación de LM el cual consistió en un embudo de separación colocado en un soporte universal y se uso como filtro un cuadro de gasa doblado en cuatro partes para tener una malla con apertura de 2mm cuya finalidad fue retener los restos no digeridos mientras la solución ácida quedó en el embudo, dejándose reposar alrededor de 1 hora para la formación de un botón color rosado de larvas el cual fue recuperado en tubos cónicos de 15 mL para su centrifugación a 3500 rpm por 2 minutos y se realizaron 3 lavadas con una solución de amortiguamiento de fosfatos (PBS), además se retiró mediante aspiración con pipeta Pasteur los detritos que se caracterizan por ser restos de tejido de color café que no fueron digeridos y pueden estar en la parte superior o en el interior del botón de larvas (figura 15.6).

Para conocer la cantidad de larvas presentes en la suspensión, se tomaron 3 alícuotas de 10 µL con el botón homogenizado mediante agitación manual, cada una colocándose en un solo portaobjetos, observándose a 10 aumentos y se contó el número de larvas musculares en cada gota obteniendo el promedio y dividiendo entre el volumen total (figura 15.7).

Esta actividad es importante tanto para realizar la dosificación en la infestación en animales de experimentación como en la cantidad de medio de cultivo para la obtención de los productos de excreción y secreción.

Se administró por vía oral la cantidad de larvas en relación al peso del animal siendo la referencia que para infectar una rata adulta se necesitan 7000 larvas, esperando 30 días para completar el ciclo de vida en el hospedador (figura 15.8).



Figura 15. **Diagrama de flujo de la propagación de la cepa.** 15.1 Se eutanasia las ratas y se remueven extremidades, cola, cabeza; posteriormente se eviscera. 15.2 Se separan del resto de la canal el diafragma, lengua y maseteros. 15.3 Limpieza de la canal con agua a chorro y se trituró en el picador de carne. 15.4 Triquinoscopia del diafragma para observar grado de infestación muscular. 15.5 Montaje del sistema de digestión artificial con la carne picada. 15.6 Montaje de sistema de recuperación con malla de 2mm. 15.7 Conteo en microscopio para conocer numero de LM y ajustar la dosis. 15.8. Dosificación por vía oral de 7700 LM en ratas Wistar para producción de antígeno.

5.4 Obtención de los productos de excreción y secreción en la LM de *T.spiralis*

A partir de las larvas musculares obtenidas de ratas (figura 16), se realizaron cinco lavados con PBS y en cada uno se centrifugó a 3,500 rpm durante 5 minutos (figura 16.2) y se removieron los detritos presentes (figura 16.1). Las larvas se colocaron en un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 80%), montado en una probeta de 50 mL para retirar el restos de detritos y larvas muertas que pudieran encontrarse en el botón durante 30 minutos en reposo, terminado ese tiempo, se recuperaron las larvas presentes en la interfase de 20 y 40% usando una pipeta Pasteur, para colocar el volumen de larvas y solución de dextrosa en un tubo cónico con la finalidad de volver a hacer lavados mencionados anteriormente tomando en cuenta la agitación manual previo a la centrifugación debido a que la dextrosa se mantuvo adherida a las larvas y no formaría el botón al momento de la centrifugación (figura 16.3).

Se realizó el conteo de larvas previamente mencionado (figura 11.4) y se realizaron 5 lavados con PBS estéril con antibióticos en una relación de 500 U/mL de penicilina y 500 µg/mL de estreptomina por litro de PBS y se continuo con 2 lavados con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EEUU), cada lavado tuvo 3 minutos de centrifugación a 3,500rpm. Finalmente, las larvas se colocaron en un frasco de cultivo (Costar Corning; New York, EEUU) con el medio RPMI 1640 en una relación de 10,000LM por cada 0.200mL a 37°C con una atmosfera de CO₂ al 5% (figura 11.5) durante intervalos de 48 horas, siendo recuperado el sobrenadante, cambiándose por medio de cultivo nuevo (figura 16.6).

El volumen que se obtuvo entre cada colecta se preservó a congelación a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso. Antes de añadir los inhibidores enzimáticos, N-alfa-tosil-lisina-clorometilcetona (TLCK), N-tosil-L-fenilalanina-clorometilcetona (TPCK), sal sódica de p-hidroximercuribenzoato (PHMB), fenilmetil-sulfonil-fluoruro, (PMSF) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); se

separó una porción de los PES para determinación de proteínas. Los inhibidores enzimáticos (figura 16.7) se agregaron de la siguiente manera: por cada mililitro de antígeno se colocó 59µL TPCK (1mg/mL en metanol), 59µL TLCK (1mg/mL en agua), 47µL PHMB (0.04% en NaOH 2N), 7µL de PMSF (0.06% en Isopropanol) y 5µL EDTA (1M).

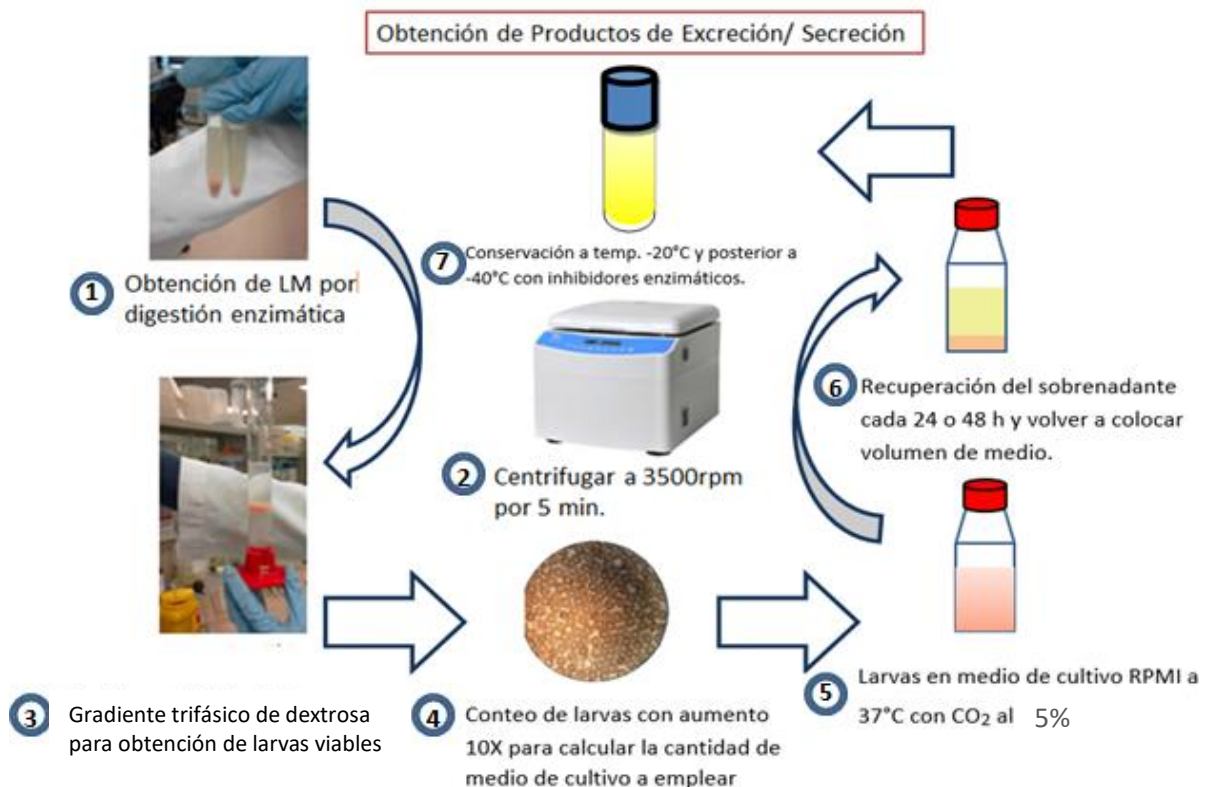


Figura 16. Diagrama de flujo para la obtención de productos de excreción y secreción de la LM de *Trichinella spiralis*. 16.1 Recuperación de LM mediante digestión enzimática. 16.2 Los lavados se hacen con centrifugación a 3500 rpm por 5 min en todas las etapas requeridas. 16.3 Se colocaron las larvas en el gradiente trifásico de dextrosa y se recuperaron en la interfase de 20 y 40%. 16.4 El conteo en el microscopio para calcular la cantidad de medio que se va ocupar por el número de LM presentes. 16.5 Se colocan las larvas en medio de cultivo (color durazno) y se mantienen a 37°C con atmosfera de CO₂ al 10% 16.6 Se recupera el sobrenadante a las 48 h y se coloca nuevo volumen de medio de cultivo. 16.7 Conservación de PES a -20°C y posteriormente a -40°C al agregar inhibidores se tornan amarillos.

5.5 Cuantificación y comprobación de integridad de productos de excreción y secreción *T. spiralis*

5.5.1 Cuantificación por método colorimétrico de Bradford.

Para conocer la concentración de las proteínas antigénicas presentes en el sobrenadante (figura 17.1), se realizó una cuantificación mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Se construyó la curva patrón en un intervalo de concentración de 0.01-0.1 mg/mL (cuadro 15) a partir de una solución estándar de Albúmina suero bovino Albúmina fracción V concentración de 2.0 mg/mL (Pierce; Rockford Illinois, EEUU) que se diluyó 1:1 con agua bidestilada (figura 17.2).

Intervalo de medida (0.01-0.1mg/mL)										
Soluciones patrón (mg/mL)	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
µL de solución estándar	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
µL de agua bidestilada	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900
Volumen final en µL	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Cuadro 15. Preparación de la curva patrón para la determinación de proteínas.

Las muestras se prepararon en una dilución 1:1 para un volumen final de 500µL con PBS y se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar Corning; New York, EEUU) un volumen de 10µL de la solución patrón/solución muestra y 200µL del reactivo de Bradford (Bio-rad, EEUU) por duplicado, esta relación se realizó también para colocar el pozo Blanco y la concentración 0 con PBS(cuadro 16).La absorbancia se leyó en un lector de microplacas para absorbancia (Tecan, Sunrise) con una longitud de onda de 595nm (figuras 17.3 y 17.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1	Blanco
B	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.10	0.09	0.1	Blanco
C	L1	L2	L3	L4								
D	L1	L2	L3	L4								
E												
F												
G												
H												

Cuadro 16. **Esquema general de llenado de la curva patrón y muestras.** En azul pozos para curva patrón y en verde pozos con las muestras de cada lote.

5.5.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (SD-PAGE).

Se sometió a las proteínas a condiciones denaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 12% (de la Rosa, 2012), en el cual se agregó el antígeno en una solución amortiguadora de muestra (EDTA, Glicerol, SDS al 10%, Tris-HCl 0.5M pH 6.8, Azul de bromofenol al 0.05%, 2- β mercaptoetanol y agua bidestilada) y se calentó por 10 min en baño María.

Las muestras se colocaron en un gel analítico a un volumen de 8 μ L por carril siendo su concentración de 3 μ g en 0.5cm, se colocó un marcador de peso molecular (Sigma, EEUU) que contenía β -Galactosidasa (116 kDa), Álbamina bovina (66 kDa), Álbamina de huevo (45 kDa) y Anhidrasa carbónica (29 kDa) para poder observar las bandas correspondientes a los pesos de 45, 49 y 55 kDa (figura 17.5). Se utilizó un equipo de electroforesis (Bio-rad, modelo mini Protean II) con el corrimiento inicial a 100 volt hasta que las muestras penetraron el gel concentrador y después se aumento el voltaje a 120 volt durante una hora (figura 17.6) para su posterior teñido con una solución de azul de Coomasie al 0.06% por una noche y decolorados con una solución de alcohol-acético-agua (figura 17.7).

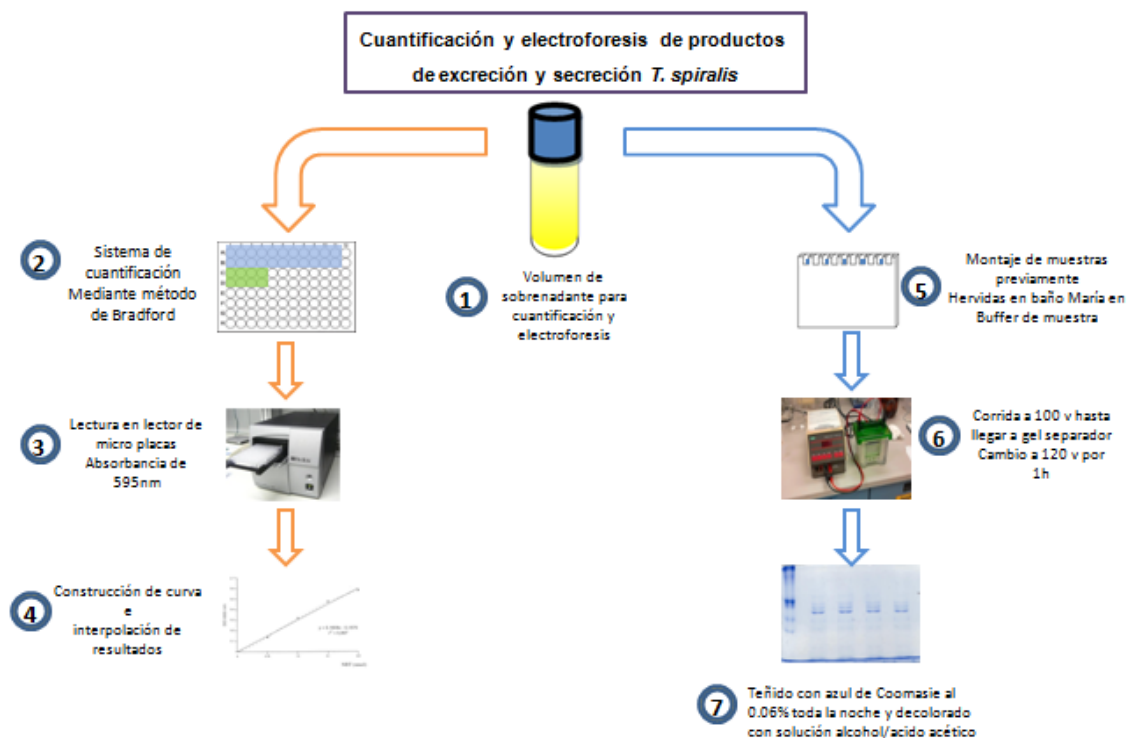


Figura 17. **Diagrama de cuantificación y electroforesis de PES *T.spiralis*.** 17.1 Volumen fraccionado de antígenos para cuantificar y hacer electroforesis. 17.2 Microplaca con los sistemas curva patrón (Azul) y lotes de antígeno (Verde) por duplicado. 17.3 Empleo de lector de microplacas a una absorbancia de 595nm. 17.4 Construcción de curva patrón e interpolación de los resultados para obtener la concentración de antígeno. 17.5 Montaje de muestras en un gel de poliacrilamida al 12% alternando las muestras entre los carriles y agregando el marcador de peso molecular. 17.6 Corrida a 100 volt hasta llegar al inicio del gel separador, cambio a 120 volt por 1h. 17.7 Desmontado el gel se tiñe con Azul de Coomasie al 0.06% toda la noche y se decolora con solución alcohol-acético-agua hasta apreciar las bandas (45,49 y 55 kDa).

5.6 Inmunolectrotransferencia

La inmunolectrotransferencia se llevo a cabo con ligeras modificaciones de acuerdo al procedimiento previamente descrito por Tinoco-Velázquez *et al.*(2002; figura 18); los geles se prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante de las cámaras de electroforesis (Bio-rad).Se realizaron geles preparativos de poliacrilamida al 12%, donde se separaron las proteínas de los productos de excreción y secreción a una corriente de 120 volts (figura 18.1), finalizado el procedimiento se colocó cada gel en un cartucho para

transferencia(figura 18.2), el cual estaba conformado en cada extremo de una esponja, 2 papeles filtro, un solo papel de nitrocelulosa y el gel preparativo poniendo la corriente a 100 volts por una hora (figura 18.3). La membrana de papel de nitrocelulosa con poro 0.2 μ m (Schleicher & Schuell, EEUU) se colocó en un recipiente con una solución de bloqueo de leche descremada al 2.5% en PBS-Tween al 1% la cual estuvo en agitación constante alrededor de una hora a temperatura ambiente (figura 18.4) y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05%, luego se cortaron tiras de 3mm de ancho y se separó el marcador de peso molecular (figura 18.5).

A continuación se realizó la reacción inmunoenzimática colocando un volumen de 500 μ L de suero problema en una dilución 1:800 en agitación constante por una hora (figura 18.6), lavando las tiras 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween al 0.05%. Se colocó el anti anticuerpo de Proteína A (GeneTex, EEUU) en un volumen de 500 μ L para cada tira en una dilución 1:2000 y se incubó 2 horas en agitación constante (figura 18.7), al final se realizaron 3 lavados solo con PBS por 5 minutos en agitación (figura 18.8). Al final se agregó una solución de diaminobencidina (DAB) a 7.5mg/mL y peróxido de hidrógeno al 30% para su posterior paro con agua bidestilada al detectarse la aparición de las bandas en las tiras de nitrocelulosa (figura 18.9).

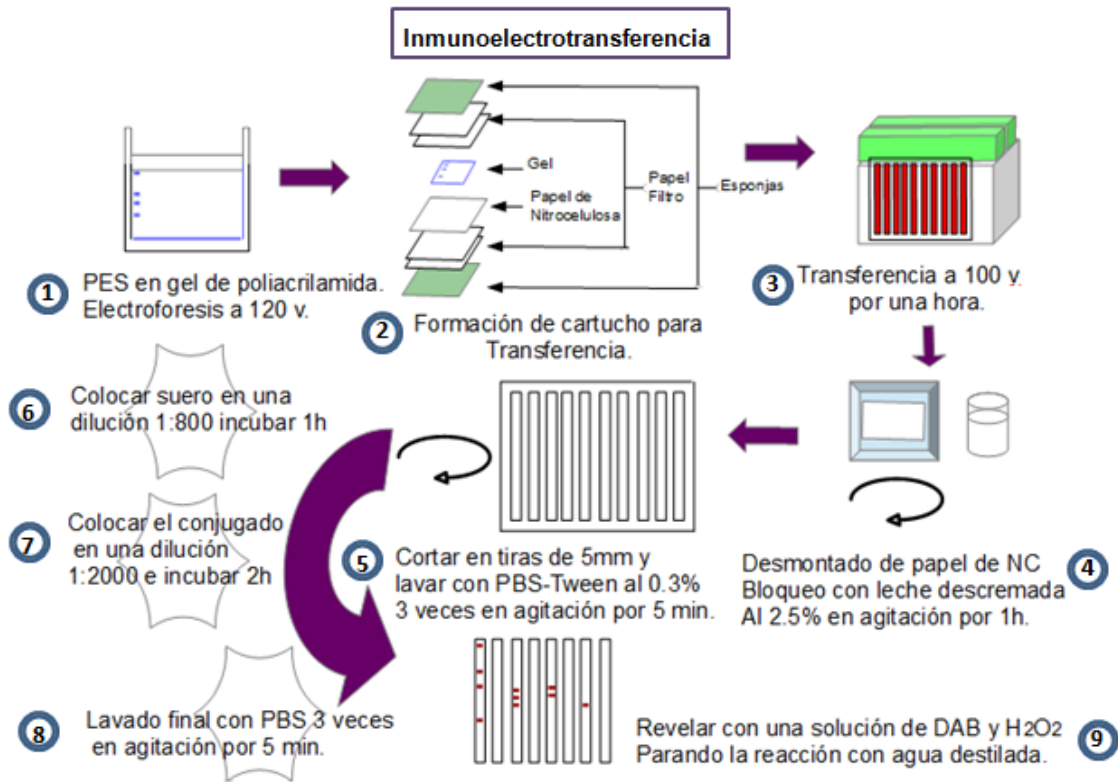


Figura 18. **Diagrama de flujo de la inmunoelctrotransferencia.**18.1 Electroforesis de PES en gel preparativo a 120 volt. **18.2** Construcción de cartucho de transferencia. **18.3** Cartucho en cámara de transferencia por 1h a 100 volt. **18.4** Etapa de bloqueo de la membrana de NC en leche descremada por 1h. **18.5** Corte de tiras de 5mm y lavados con PBS-Tween al 0.3%. **18.6** Adición del suero e incubación a 1h. **18.7** Adición del conjugado e incubación a 2 h. **18.8** Lavado final con PBS. **18.9** Revelado con el sustrato y paro de reacción con agua bidestilada se aprecian las bandas en las tiras.

5.7 Inmunopunto o Dot-ELISA

Un cuadro de papel de nitrocelulosa con poro de 0.2 μ m (Schleicher & Schuell, EEUU) de aproximadamente de 30 x 15 cm, se sumergió en agua bidestilada para posteriormente dejarlo secar en una base de vidrio con un ángulo de 45°, se empleó una perforadora de papel para obtener círculos de un diámetro de 6 mm los cuales se colocaron en un frasco color ámbar sellado y mantenido a 37°C para eliminar la humedad. La técnica se realizó con ligeras modificaciones como lo describe Aguilar-Figueroa et al.(2000; figura 19), se colocaron 3 μ L de

los PES mediante una micropipeta en el centro de cada círculo, luego se colocaron en una estufa de incubación a 37°C por 15 minutos (figura 19.1) para su posterior montaje en una placa de 24 pozos de fondo plano y se realizaron 3 lavados con un volumen de 500 µL de PBS-Tween al 0.3% en agitación constante a temperatura ambiente por 5 minutos, retirando el volumen entre cada lavado (figuras 19.2 y 19.3).

El bloqueo de los sitios reactivos de la nitrocelulosa se llevó a cabo mediante la adición de 500 µL de leche descremada al 5% en PBS-Tween al 0.3% por pozo en agitación constante y temperatura ambiente por 15 minutos (figura 19.4), se eliminó el volumen de los pozos y se repitió el lavado con PBS-Tween al 0.3%. Se colocó la solución de muestra problema a una dilución de 1:800 en un volumen de 500µL dejando en agitación constante y temperatura ambiente por 15 minutos (figura 19.5). Después de realizados los 3 lavados ya mencionados se colocó la Proteína A (GeneTex, EEUU) a una dilución de 1:2000 en un volumen de 500 µL por pozo en agitación constante y temperatura ambiente por 15 minutos (figura 19.6). Por último se realizaron 3 lavados con PBS-Tween al 0.3% y 2 lavados con PBS por 5 minutos en agitación constante y temperatura ambiente, luego se agregó la solución de sustrato de diaminobencidina (DAB) 7.5mg/mL con peróxido de hidrogeno al 30% (figura 19.7) que actuó al menos 10 minutos hasta la aparición de una mancha marrón en el caso de ser positiva la reacción y se detuvo al adicionar agua bidestilada en cada pozo (figura 19.8).

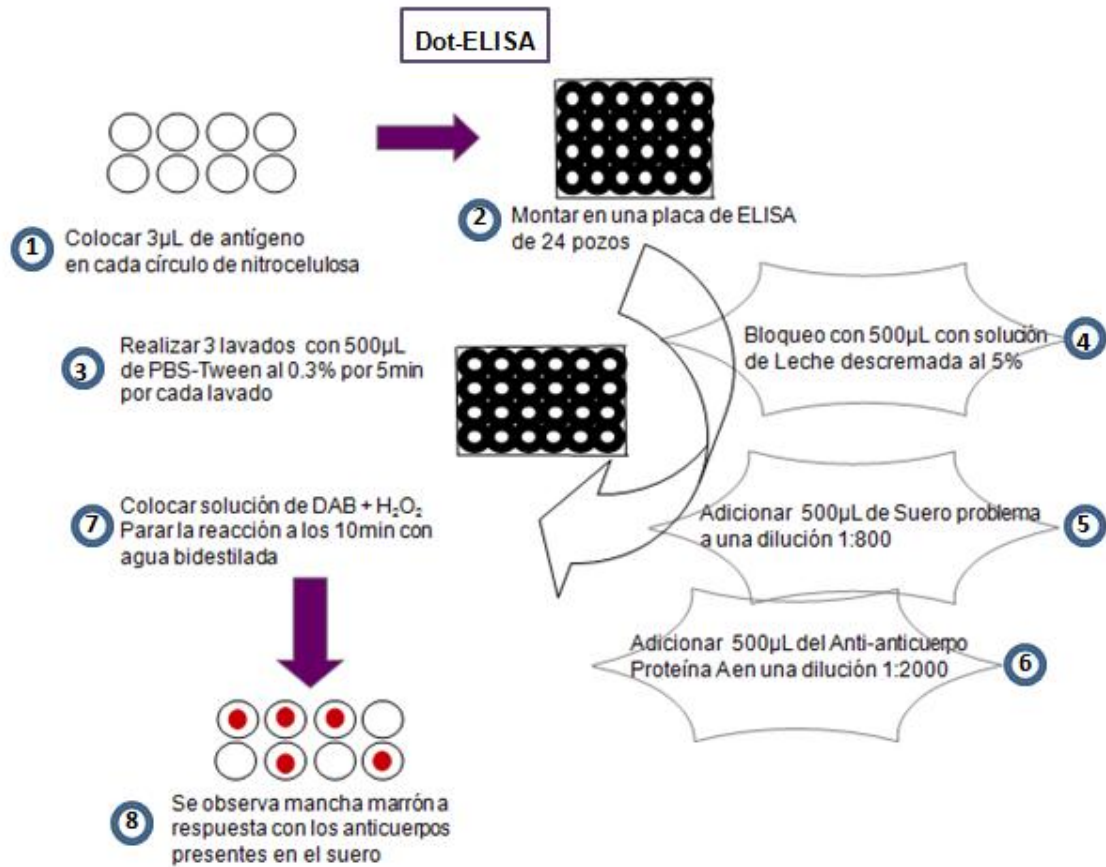


Figura 19. **Diagrama de flujo para la realización del Dot-ELISA.** **19.1** Colocación de antígeno en círculos de NC y su fijación a 37°C. **19.2** Montaje de círculos en placa de 24 pozos como contenedor del volumen a emplear. **19.3** Lavados de cada etapa de la técnica. **19.4** Etapa de bloqueo con leche descremada para prevenir uniones inespecíficas. **19.5** Adicionar el suero en una dilución 1:800 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. **19.6** Adicionar el conjugado en una dilución 1:2000 e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. **19.7** Se reveló con el sustrato y se paró la reacción con agua bidestilada. **19.8** La presencia de mancha es indicativo de reactividad con los anticuerpos contra los PES de *Trichinella spiralis*.

5.8 Análisis del estudio diagnóstico

5.8.1 Frecuencia de positividad, sensibilidad y especificidad

Debido a que en los estudios de exactitud diagnóstica se emplea un estándar de referencia o estándar de oro, en donde se establece la presencia o ausencia de una determinada condición (Bossuyt *et al.*, 2003), para este proyecto el estándar de oro fue la inmunotransferencia y la técnica de Dot-ELISA se puso a prueba.

Se empleó la tabla de contingencia (figura 20) la cual consiste en dos columnas que corresponden al resultado dicotómico positivo o negativo (presencia o ausencia) de la enfermedad, la consideración del estándar de referencia es a la presencia de 3 bandas (45, 49 y 55 kDa) y en el Dot-ELISA por la presencia de una mancha. En la construcción de cada celda se consideró a los verdaderos positivos (a), falsos positivos (b), falsos negativos (c) y verdaderos negativos (d); con esto se puede calcular la sensibilidad que corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica y la especificidad que corresponde a la proporción de individuos correctamente diagnosticados con ausencia de la condición o enfermedad por la prueba diagnóstica en estudio, mientras que la frecuencia de positividad es la relación porcentual de casos encontrados en una población determinada (Altman y Bland , 1994). El cálculo de cada uno de los valores se realizó con las siguientes fórmulas (cuadro 17):

Cuadro 17. Parámetros mínimos para análisis de un estudio diagnóstico

Parámetro	Fórmula
Frecuencia de positividad	$(N^{\circ} \text{ casos encontrados} / N^{\circ} \text{ total de individuos}) \times 100$
Sensibilidad	$[a / (a+c)] \times 100$
Especificidad	$[b / (b+d)] \times 100$

Adaptado y modificado de Bravo-Grau y Cruz-Q. (2015)

	Prueba "Gold standard"		Total
Técnica a prueba	a	b	
	c	d	
Total			

Figura 20. **Tabla de contingencia.** **a.** Son los verdaderos positivos, **b.** son los falsos positivos, **c.** los falsos negativos y **d.** los verdaderos negativos. El total es la sumatoria de los valores falsos con su respectivo verdadero.

5.8.2 Índice *kappa*

El uso de métodos estadísticos es importante en la investigación dado la fiabilidad de los procedimientos empleados, por lo cual se genera una fuente de error en la variabilidad entre los observadores, denominándose el sesgo entre observadores que permite la tendencia de un observador. Debido a esto el uso del índice kappa permite darle una dirección a los datos mediante una fórmula que excluye la concordancia debida exclusivamente al azar (Feinstein y Cicchetti, 1990). Al ser este un estudio transversal donde se compara la exactitud diagnóstica entre la prueba planteada contra la prueba estándar de referencia pueden verse influenciados los resultados con respecto a la sensibilidad que puede presentar la prueba ante los casos positivos que identifican la presencia de la infección mediante la prueba de referencia, mientras que la especificidad plantea la presencia de verdaderos negativos ante la prueba de estándar de referencia (Bravo-Grau y Cruz-Q, 2015). La máxima concordancia posible corresponde a $\kappa = 1$. El valor $\kappa = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. Si la concordancia es mayor que la esperada simplemente a causa del azar, $\kappa > 0$, mientras que si es menor, $\kappa < 0$. El mínimo valor de κ depende de las distribuciones marginales. Para interpretar el valor de κ se debe disponer una escala a pesar de su arbitrariedad donde se denomina a la fuerza de concordancia según el rango donde se presente el valor calculado siendo los extremos inferiores con concordancia pobre y débil, el rango

intermedio considerado concordancia moderada y el extremo superior con concordancia buena y muy buena por lo tanto a mayor concordancia será mejor el experimento realizado (Landis y Koch, 1977). Para realizar el cálculo del índice κ se empleó el programa en línea del sitio web vassarstats.net el cual en su interface permitió colocar los datos en una tabla de frecuencias y fundamentada con la fórmula básica de coeficiente de κ con un intervalo de confianza de 0.95 (figura 21).

		Método B		Total
		Positivo	Negativo	
Método A	Positivo	a	b	f1
	Negativo	c	d	f2
	Total	c1	c2	n

$$\kappa = \frac{[(\Sigma \text{Concordancias observadas}) - (\Sigma \text{Concordancias atribuible al azar})]}{[(\text{Total de observaciones}) - (\Sigma \text{concordancias atribuible al azar})]}$$

Figura 21. **Tabla de frecuencias y fórmula de kappa.** Se muestran los siguientes valores: (a) verdaderos positivos, (b) falsos positivos, (c) falsos negativos y (d) verdaderos negativos, (c1) es el total de positivos por el método A, (f1) es el total de positivos del método B, (c2) es el total de negativos del método A, (f2) es el total de negativos del método B y n es el total de individuos. La fórmula plantea la sumatoria de las concordancias de ambas observaciones menos la concordancia atribuida al azar dividiéndole con esa misma concordancia menos el total de observaciones.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* y producción de los productos de excreción y secreción

6.1.1 Larvas musculares

Se infectaron 4 ratas Wistar de 8 semanas de edad con un peso de $300 \pm 10g$ con 25 LM por gramo de peso que equivale a 7500 ± 250 LM suspendidas en solución de PBS (0.01M) pH 7.2, dosificándoles un volumen de 3 mL con una micropipeta. Al término de los 30 días de infección se desarrolló la metodología de obtención de tejido y digestión artificial descritos en la sección 5.3 de Materiales y Métodos, recuperándose por cada dos ratas 401500 y 360000 LM respectivamente para producción de antígenos de excreción / secreción las cuales al momento de estar en medio de cultivo se revisaron para observar su viabilidad mediante el uso de un microscopio invertido cada 24 h y se calculó el índice de capacidad reproductiva(ICR) que es la división entre las larvas obtenidas y las larvas dosificadas. En el cuadro 18 se desglosa de mejor manera los datos obtenidos:

Cuadro 18. Relación de cada rata infectada por *T. spiralis* para conocer su capacidad reproductiva.

Animales (rata Wistar)	Peso(g)	Dosis LM	LM recuperadas	ICR	Viabilidad	
R1	310	7750	200400	25.85	Enrolladas	24h
					Enrolladas y algunas no viables	48h
R2	302	7550	201100	26.63	Enrolladas y algunas no viables	72h
					Enrolladas y varias no viables	96h
R3	308	7700	180500	23.44	Enrolladas	24h
					Enrolladas y algunas no viables	48h
R4	314	7850	179500	22.86	Enrolladas y algunas no viables	72h
					Enrolladas y varias no viables	96h

6.1.2 Productos de excreción y secreción

Los productos de excreción y secreción (PES) se obtuvieron del cultivo de dos cantidades de larvas recuperadas mediante digestión artificial, 401500 (R1 y R2) y 360000 (R3 y R4) con medio de cultivo en un volumen promedio de 4 mL, se recuperó el medio que viró de naranja a ámbar al pasar 72 h con la finalidad de obtener la mayor cantidad de antígeno recuperado, realizando el cambio de medio y el retiro de larvas muertas que pudieran encontrarse en la superficie del medio. Luego de llevar a cabo la determinación de proteínas y construirse la curva patrón (figura 22)mencionada en la sección 5.5.1 de Materiales y Métodos, se interpolaron los resultados de las absorbancias de 4 lotes obtenidos de dos recuperaciones de medio por cada grupo de larvas e interpolándose en el gráfico (figura 23) dichos valores se calcularon en una dilución 1:1 y posteriormente se obtuvo la concentración real(figura 24) que se muestra en el cuadro 18, conociendo la concentración de proteínas , que cada larva produce entre 0.0015-0.0018 µg en un tiempo de 48 h(cuadro 19).

Concentración (mg/mL)	Absorbancia
0	0.228
0.01	0.263
0.02	0.289
0.03	0.321
0.04	0.360
0.05	0.380
0.06	0.425
0.07	0.455
0.08	0.482
0.09	0.494
0.1	0.529

Se obtuvo la siguiente ecuación de la pendiente :

$$y = mx + b$$

$$y = 3,0373x + 0,2323$$

$$R^2 = 0,9947$$

$$R = 0,9973$$

Figura 22. **Tabla de concentraciones y absorbancias de la curva patrón.** Se obtuvo la ecuación de la pendiente donde (y) es el valor dependiente, (x) el valor independiente, (m) valor de la pendiente, (b) intersección con el eje "y", (R) coeficiente de correlación y (R²) coeficiente de determinación.

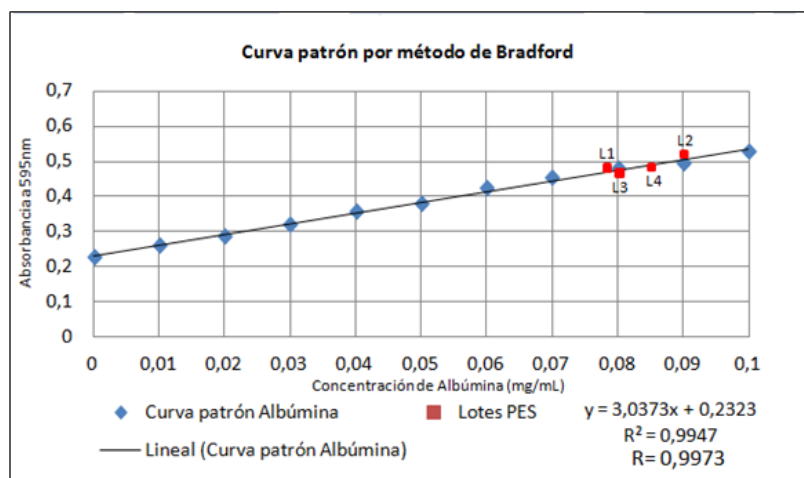


Figura 23. **Curva patrón de proteínas mediante el método de Bradford.** Se construyó a partir de 10 concentraciones conocidas de albúmina fracción V (puntos azules) como referencia para conocer la concentración de las proteínas presentes de los PES y la fórmula ($y=3.0373x + 0.2323$) permitió conocer la cantidad interpolada (puntos rojos).

Para conocer la concentración real del antígeno presente en cada uno de los lotes se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Conc.} = \frac{\text{Volumen final del sistema} \times \text{Concentración obtenida}}{\text{Volumen de alícuota muestra}}$$

Lote	Absorbancia	Concentración a dilución 1:1 (µg/mL)	Concentración real (µg/mL)
1	0.473	79.08	158.17
2	0.508	90.55	181.10
3	0.476	80.07	160.14
4	0.493	85.56	171.27

Figura 24. **Resultados de los 4 lotes de PES a partir de una dilución 1:1.** Se muestran cada lote con su respectiva absorbancia, concentración en dilución 1:1 y su concentración real.

Cuadro 19. **Relación del rendimiento por larva con respecto a cada lote y su número de larvas totales.**

Lote	Número de ratas	Número de LM	Concentración de antígeno (µg/mL)	Volumen (mL)	Rendimiento (µg/LM)
1 (a 48h)	2	401500	158.17	4	0.0015
2 (a 96h)			181.10	2	0.0009
3 (a 48h)	2	360000	160.14	3.5	0.0015
4 (a 96h)			171.27	3.8	0.0018

Para determinar el patrón electroforético, los PES se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% que al tener la concentración conocida se ajustó la cantidad de estos en el carril colocándose una concentración de 3µg en 0.5cm con un volumen de 8µL intercalándose cada muestra previamente puesta en baño María por 10 minutos en su solución de amortiguadora de muestra en condiciones desnaturizantes como se describe en la sección 5.5.2 de Materiales y Métodos además de incluir un marcador de peso molecular (Sigma, EEUU). El corrimiento se realizó a 100 volt hasta llegar del gel concentrador al gel separador y posteriormente se aumentó a 120 volt por 1h, se visualizaron las bandas con una tinción de azul de Coomasie (figura 25).

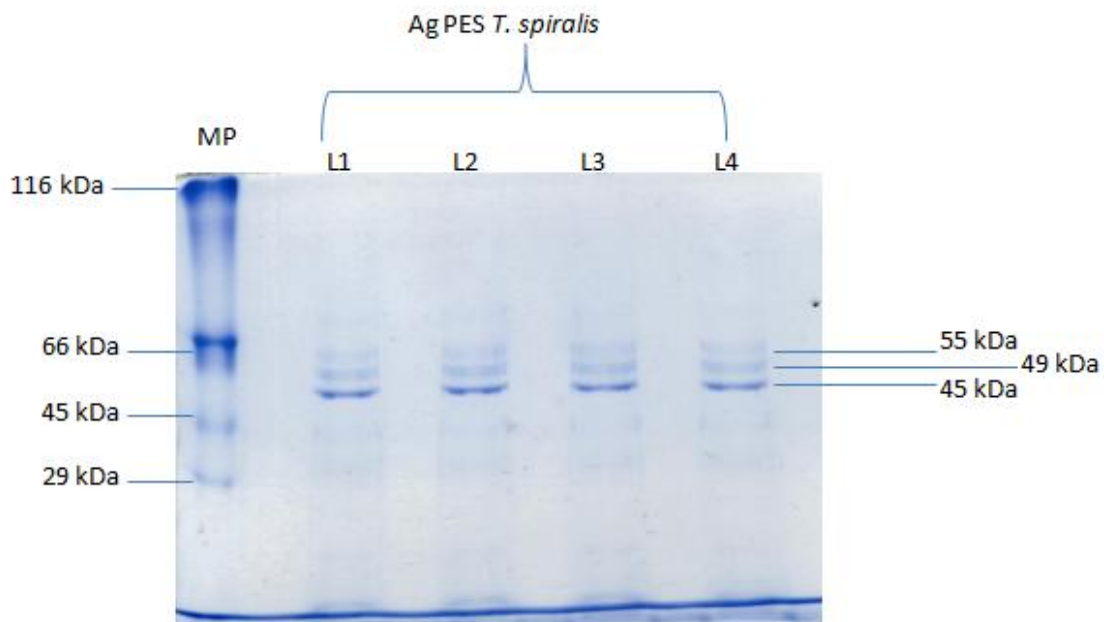


Figura 25. **Gel de poliacrilamida al 12% con los PES de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.** Se observa en el carril 1 el marcador de peso molecular; en los carriles 3, 5, 7, 9 los antígenos de productos excreción/secreción estando presentes los pesos de 55, 49, 45 kDa.

6.2 Características de las muestras de suero de caballo.

Se tomaron 300 muestras de suero de caballo del banco de muestras presentes en el laboratorio de Inmunoparasitología del InDRE, obtenidas bajo oportunidad en los estados de México, Jalisco y Veracruz. Las muestras consistieron de alícuotas entre 0.5 a 2 mL en el caso de muestras únicas pero no se contó con los datos generales del donador. Se procesaron 100 muestras por rastro.

En las pruebas serológicas se empleó una reducida cantidad de suero y no se vió una alteración significativa por las características de los sueros trabajados (cuadro 20), sin embargo la recomendación que se tiene para las muestras de caballo solo aplica en que no deben presentar hemolisis (Hill y col., 2007^b).

Cuadro 20. Aspecto, color, características y alteraciones en las muestras de suero en caballo

Tipo de suero	Color	Alteración	Causa	Referencia
Normal	Casi transparente	Con niveles normales de sus componentes	Toma correcta de la muestra y en el horario de ayuno.	Quiroz-Rocha y Bouda, 2007
Ictérico	Amarillo a diferente intensidad	Presencia de bilirrubinas o pigmentos carotenoides	La presencia de bilirrubinas no conjugadas no necesariamente sucede por problemas hepáticos. Puede presentar neumonía, daño en intestino grueso, enteritis y poco consumo de alimento.	Viu, 2012; Tennant y Center, 2008
Lipémico	Marrón	Presencia de lipoproteínas de muy baja densidad	En caso de no tomar la muestra 8-12 h después de su alimentación o bien si presenta colestasis, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y lipidosis hepática.	Quiroz-Rocha y Bouda, 2007; Díaz-C <i>et al.</i> , 2008
Hemolizado	Rojo	Presencia de hemoglobina por eritrocitos destruidos	Extravascular. Durante la toma de muestra o posterior a esta. Intravascular. Debida a un cuadro de hemoglobinemia.	Latimer <i>et al.</i> , 2005

6.3 Anticuerpos contra *Trichinella* en las muestras de suero de equino por inmunoelctrotransferencia

A partir de las tiras obtenidas por la transferencia, los antígenos de excreción/secreción provenientes de la separación del gel preparativo de poliacrilamida al 12%, se tomaron las condiciones para la reacción inmunológica consideradas óptimas a una dilución de suero 1:800 y 1:2000 del conjugado proteína A (GeneTex, EEUU) diluidos en una solución de PBS-Tween al 0.3% con un volumen final de 500µL misma que se empleó para los lavados entre cada etapa, como se describió en la sección 5.6 de Materiales y Métodos.

Se ocupó el mismo marcador de peso molecular (Sigma, EEUU) en la transferencia, para tener una referencia mediante un control positivo y un control negativo esto fue a partir de suero de ratón infestado experimentalmente para la muestra positiva mientras que el suero de un ratón sano sin infectar se consideró como muestra negativa, ambos previamente estandarizados con proteína A debido a la falta de una muestra de caballo positivo al momento de realizar este estudio.

6.3.1 Rastro del Estado de México

Como resultado para el rastro del Estado de México con un total de 100 muestras (figura 26), se encontraron 4 sueros considerados como reactivos con una banda de peso molecular de 45 kDa (tiras 11, 71, 72 y 76) y un positivo a las 3 bandas (45, 49 y 55 kDa) (tira 17).

6.3.2 Rastro del Estado de Jalisco

En el caso de las muestras del rastro de Jalisco con un total de 100 muestras (figura 22) solo se encontraron 4 sueros (tiras 14, 42, 59 y 62) con reactividad una banda de 45kDa.

6.3.3 Rastro del Estado de Veracruz

Con respecto a las muestras del estado de Veracruz (figura 23) se encontraron 3 sueros con reactividad a una banda de 45kDa (tiras 18, 19, y 21) y 5 positivos a las 3 bandas de 45, 49 y 55 kDa (tiras 4, 14, 23, 33 y 83).

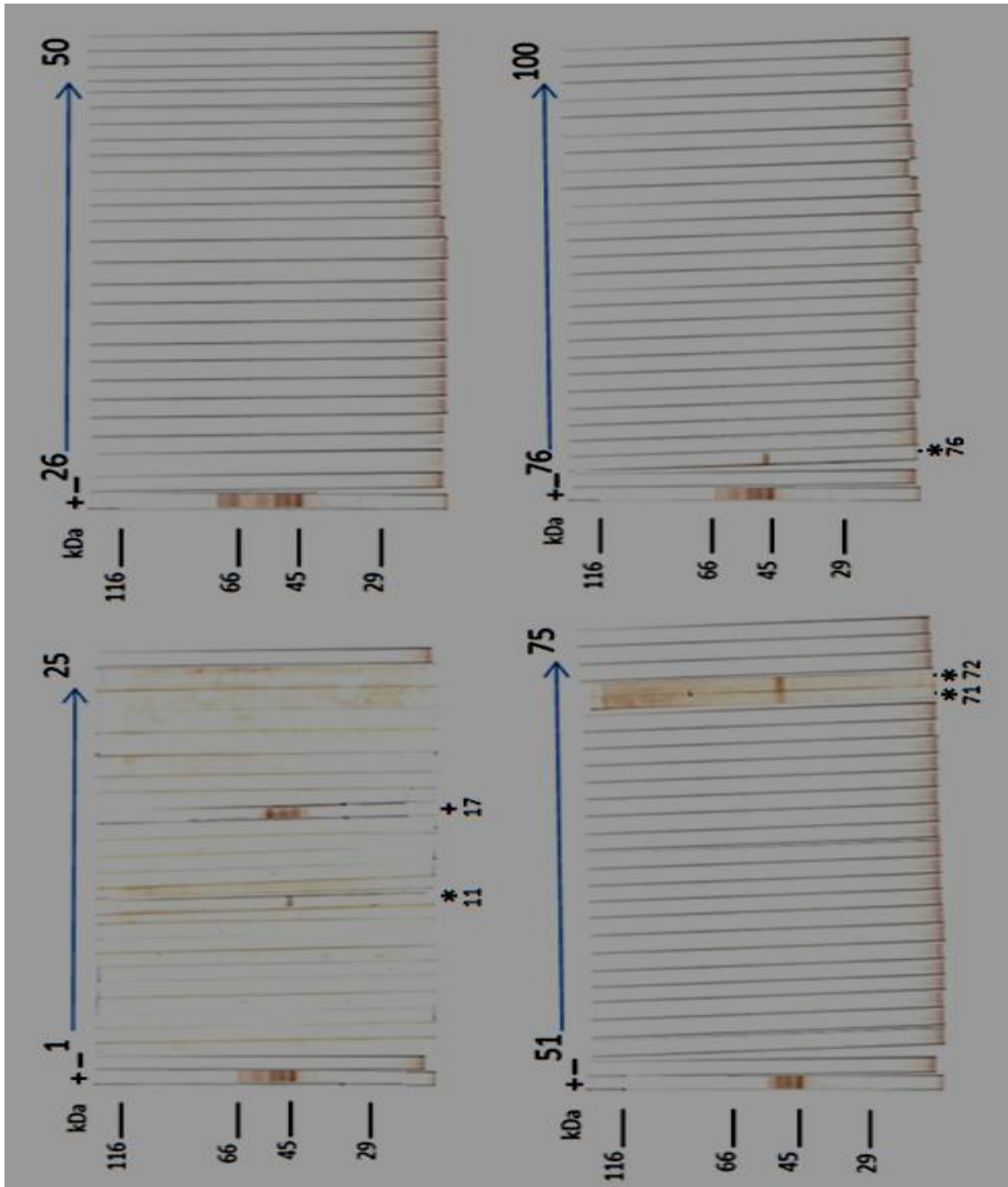


Figura 26. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de México contra los productos de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*. Cada tira es una muestra de suero que conforman 4 paneles de 25 cada una, se muestra la reactividad de un suero positivo (+) y uno negativo (-). El corrimiento del marcador del peso molecular se muestra a la izquierda. Con un asterisco se muestra los sueros reactivos con una banda y con una cruz los sueros con reactividad positiva.

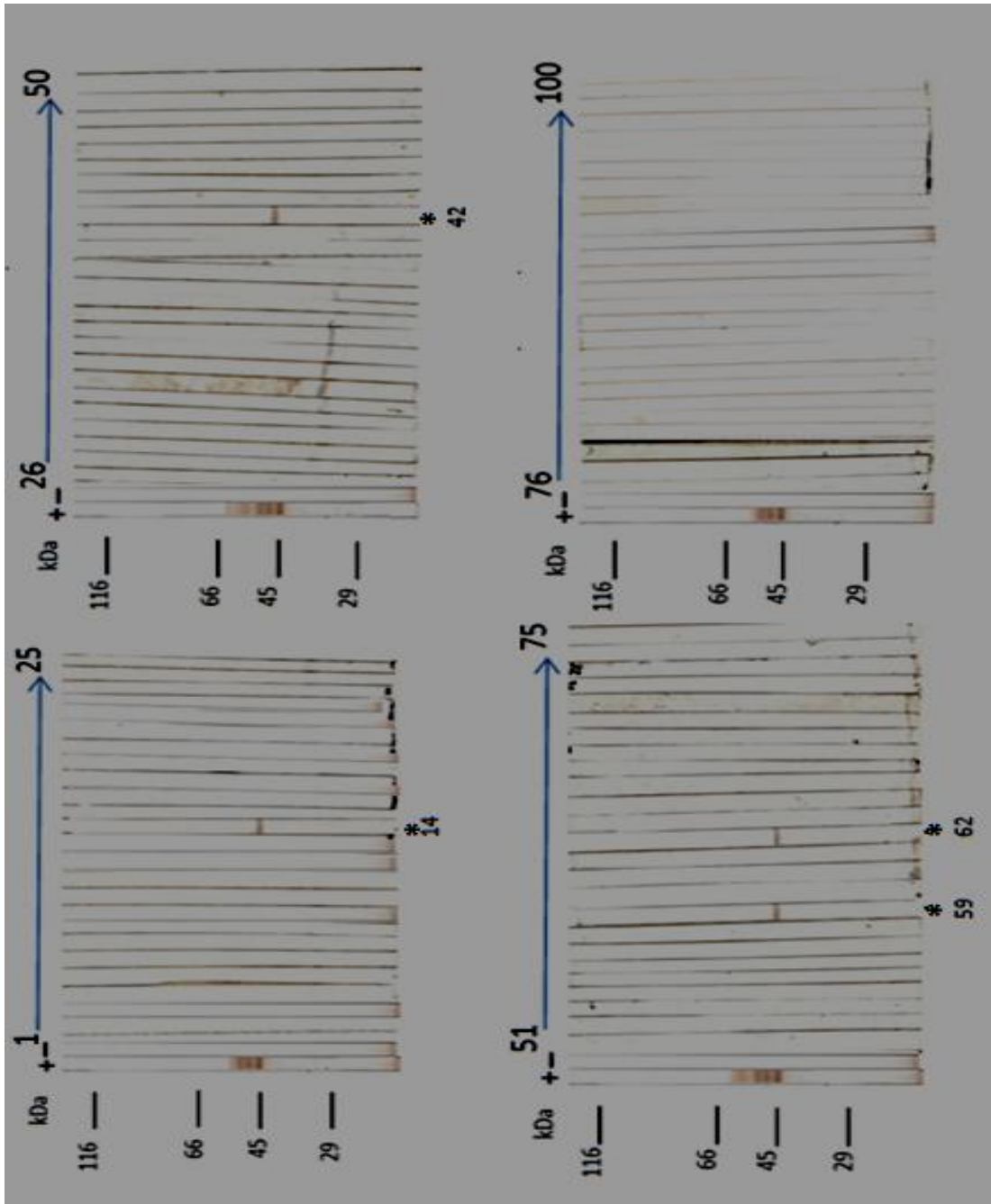


Figura 27. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de Jalisco contra los productos de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*. Cada tira es una muestra de suero que conforman 4 paneles de 25 cada una, se muestra la reactividad de un suero positivo (+) y uno negativo (-). El corrimiento del marcador del peso molecular se muestra a la izquierda. Con un asterisco se muestran los sueros reactivos con una banda. Hay ausencia de muestras con reactividad positiva.

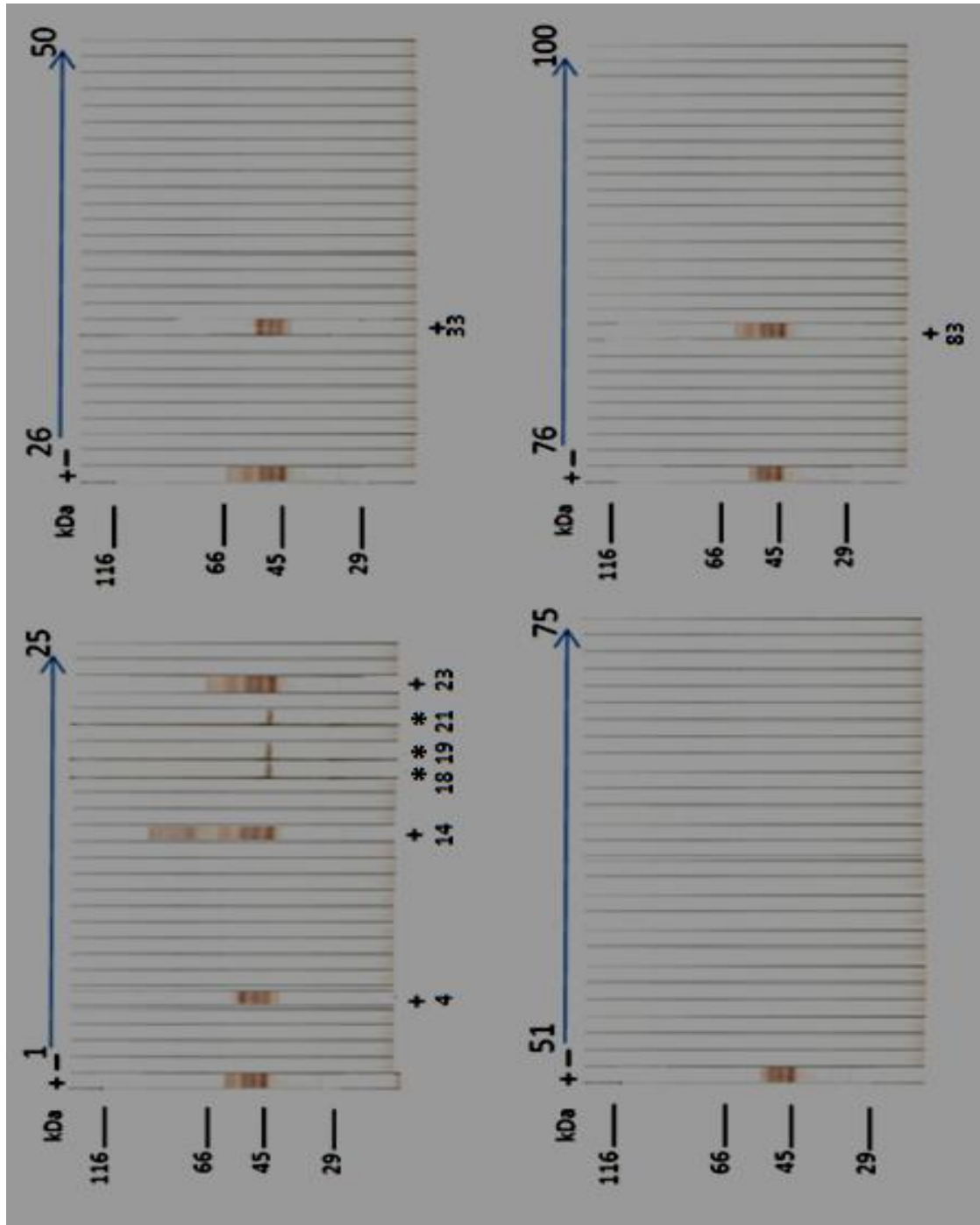


Figura 28. Reactividad de los sueros de caballo del Estado de Veracruz contra los productos de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*. Cada tira es una muestra de suero que conforman 4 paneles de 25 cada una, se muestra la reactividad de un suero positivo (+) y uno negativo (-). El corrimiento del marcador del peso molecular se muestra a la izquierda. Con un asterisco se muestran los sueros reactivos con una banda y con una cruz los sueros con reactividad positiva.

6.3.4. Muestras positivas

Al obtener los resultados de las 300 muestras de caballo se encontraron un total de 6 caballos con reactividad a las 3 bandas y 11 reactivos a una banda de 45 kDa (figura 29), con estos datos se calculó la frecuencia de positividad considerando la presencia de 3 bandas (55,49, 45 kDa) y la frecuencia de positividad a una banda de 45 kDa como se menciona en la sección 5.8.1.

Frecuencia de positividad

Presencia a 3 bandas: $(6/300) \times 100 = 2\%$

Presencia de 1, 2 o 3 bandas: $(17/300) \times 100 = 5.6\%$

Localidad	Bandas (55,49,45 kDa)	Banda de 45 kDa
Estado de México	1	4 reactivos
Jalisco	0	4 reactivos
Veracruz	5	3 reactivos
Total	6	11

Figura 29. **Relación de resultados en WB por estado.** Se observó reactividad en los tres estados de la república evaluados mediante WB y solo Jalisco no presentó reacción positiva en las 100 muestras y las de Veracruz presentaron el mayor número de caballos con anticuerpos contra los PES de *Trichinella spiralis*.

6.4 Instrumentación del Dot-ELISA y determinación de anticuerpos contra *Trichinella* en el suero de caballo.

Se estandarizó la técnica de Dot-ELISA utilizando muestras de suero de animales experimentalmente infectados en el laboratorio como fuente de anticuerpos específicos. Se emplearon muestras de suero de rata, ratón y cerdo.

La figura 30 muestra la instrumentación del Dot-ELISA a partir de animales infectados experimentalmente en el laboratorio donde se emplearon diluciones dobles seriadas para conocer la reactividad en un control positivo y un control negativo, el cual se define con la presencia de mancha y ausencia de esta respectivamente. El antígeno se colocó en un volumen de 3 μ L y se partió de una dilución 1:25 hasta llegar a una dilución 1:12800 del suero, donde se utilizó de manera general la dilución 1:2000 del conjugado anti-rata (Sigma, EEUU) en el suero de rata, de la Proteína A (GeneTex, EEUU) para el suero de ratón y el conjugado anti-cerdo (Sigma, EEUU). El procedimiento fue similar a lo descrito en la sección 5.7 de Materiales y Métodos.

Debido a los datos obtenidos y la reactividad de fondo en los sueros de ratón y cerdo, se realizó la instrumentación con el suero de caballo empleándose 4 muestras que se utilizaron en el ensayo de WB, 3 tres de ellas positivas (Muestras N^o 17,223 y 283) y una negativa (muestra N^o 102), empleándose el volumen de antígeno igual que en los ejemplos anteriores, la dilución de suero a partir de 1:25 pero solo llegando hasta una dilución de 1:3200 debido a que la intensidad de la mancha se vio disminuida en los otros sueros, por último se empleo la Proteína A con una dilución 1:2000 (figura 31).

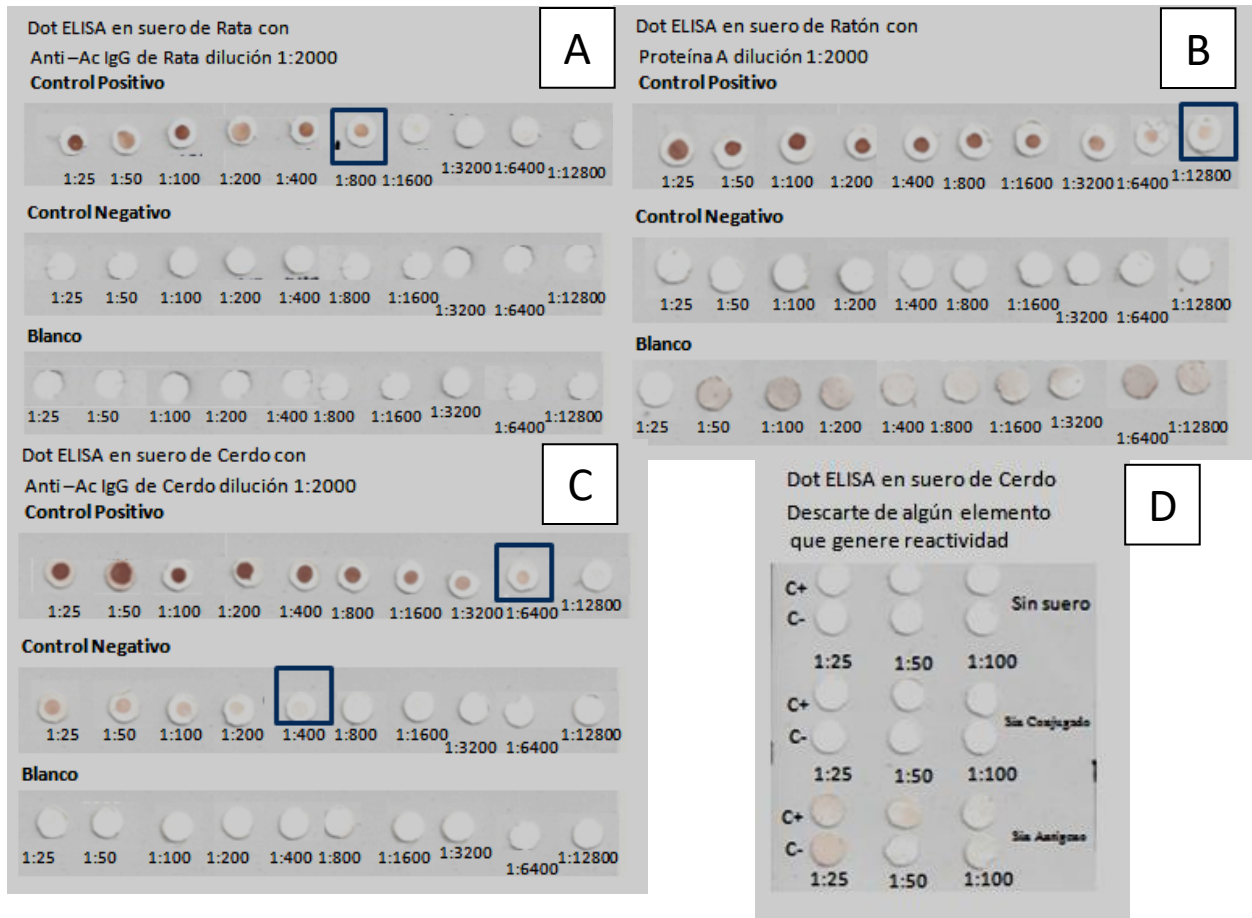


Figura 30. Instrumentación del Dot-ELISA en diferentes modelos de infección experimental (rata, ratón y cerdo). Panel A. Se muestran las diluciones dobles seriadas del control (+), control (-) y blanco en rata con conjugado anti-rata con límite en la presencia de mancha a una dilución 1:800 del suero (+) y ausencia de mancha en el suero (-). Panel B. Se muestran las diluciones dobles seriadas del control (+), control (-) y blanco en ratón con proteína A, su límite de reactividad fue en la dilución 1:12800 como una reacción de fondo y ausencia de mancha en el control (-). Panel C. Se muestran las diluciones seriadas del control positivo, control negativo y blanco en cerdo con conjugado anti-cerdo, la reactividad del control positivo se mantuvo hasta la dilución 1:6400 mientras el control negativo llegó a la dilución 1:400. Panel D. Se empleó los sueros control de cerdo para ver si alguno de los elementos del procedimiento generaba la reacción de fondo, no se encontró reactividad.

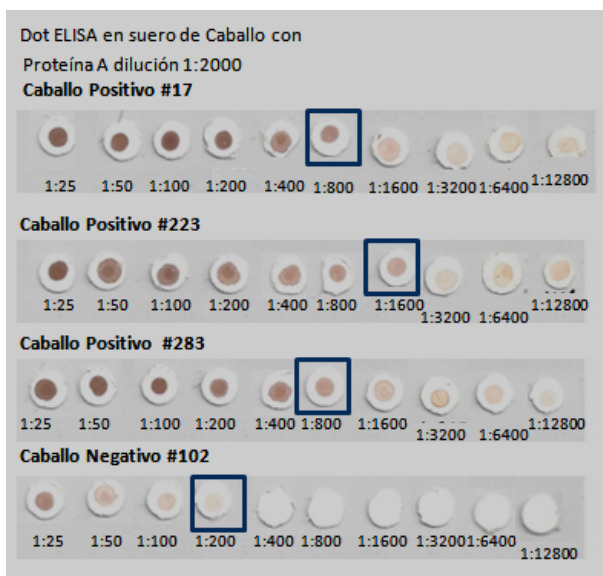


Figura 31. **Instrumentación del Dot-ELISA en caballo.** Se observó reactividad en los 4 caballos a pesar de estar muy diluida la muestra. La consideración de una mancha intensa en las muestras positivas fue similar en 2 de las 3 muestras con una dilución 1:800 (Muestras N°17 y N°283) mientras que la tercera fue de 1:1600 (Muestra N°223), por otra parte el caballo negativo (Muestra N°102) solo llegó a mantener su reactividad a una dilución de 1:200.

Con los datos recogidos por cada instrumentación y considerando que el Dot-ELISA tiene un criterio de positividad con la presencia de una mancha, se decidió procesar las 300 muestras bajo las condiciones a un volumen del antígeno de 3 μ L, dilución de suero 1:800 y la dilución de Proteína A de 1:2000 considerándose la presencia de una reacción de fondo, esperando fuera menor en muestras negativas como se vió en la figura 26. Los resultados obtenidos fueron 162 muestras reactivas en su mayoría con la presencia de una mancha de baja intensidad que se consideró dentro del criterio positivo como se describe en la técnica de Dot-ELISA y solo 138 muestras sin presencia de mancha (figura 32).

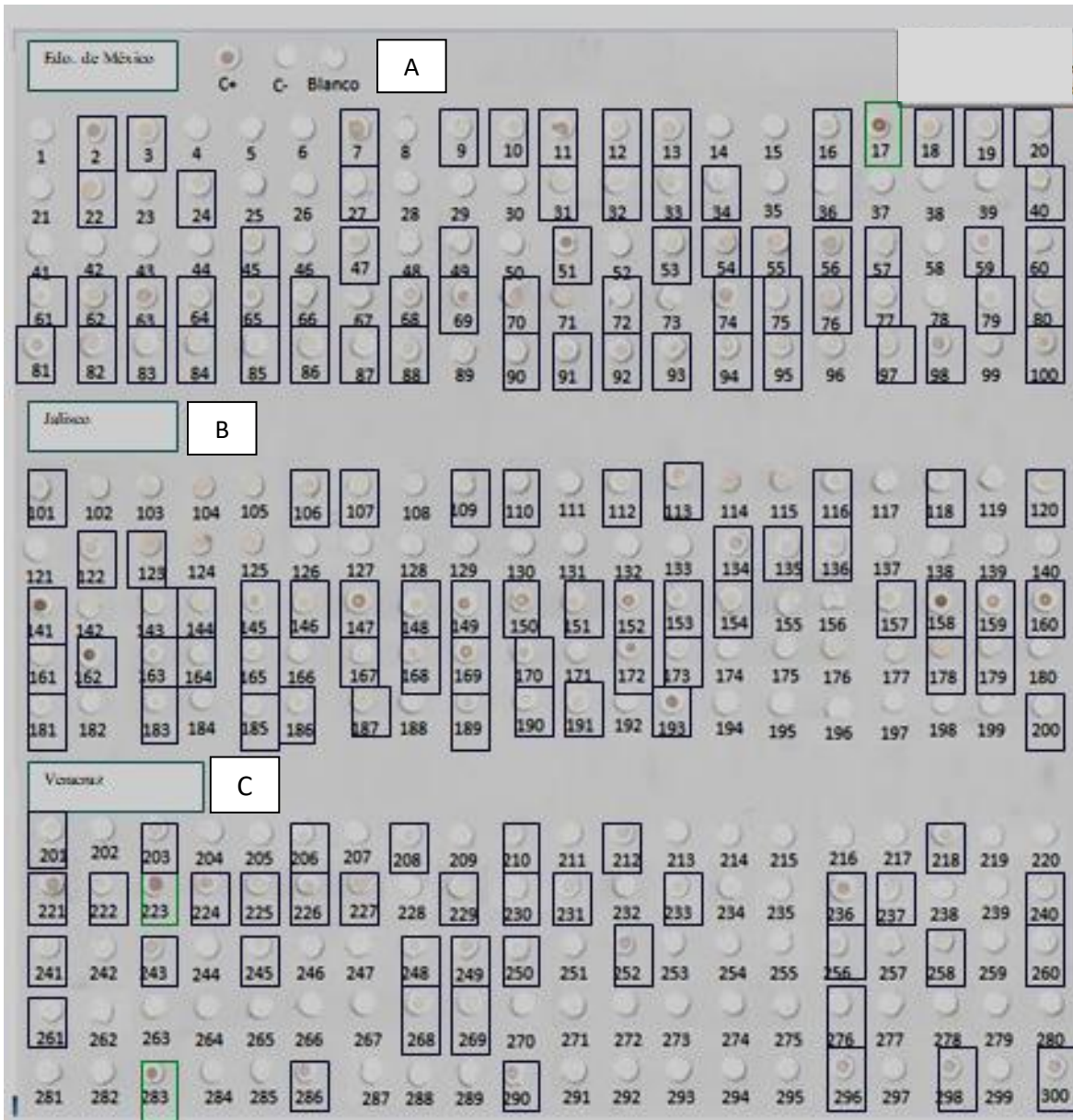


Figura 32. Reactividad de los sueros de caballo contra los productos de excreción y secreción de la larva muscular de *Trichinella spiralis* por Dot-ELISA. Todas las muestras reactivas se señalaron con un marco azul, mientras las muestras reactivas en un marco verde son de las muestras que presentaron las 3 bandas en el WB. El panel **A** corresponde a las 100 del estado de México con una sola muestra con marco verde (17), panel **B** corresponde a las 100 del estado de Jalisco sin presentar reactividad en la 102 como se vió en la instrumentación del suero negativo y por último el panel (C) corresponde a las 100 del estado de Veracruz donde 2 muestras están con marco verde (223 y 283).

6.4.1 Muestras positivas al Dot-ELISA

El criterio de positividad según lo descrito en la instrumentación del Dot-ELISA fue a través de la presencia de mancha y el negativo por la ausencia de esta, sin embargo la reactividad en varias muestras afectó dicho criterio debido a que no se eliminó la reacción de fondo en las condiciones trabajadas, en la siguiente figura se colocó la proporción de muestras reactivas considerándoles como positivos y las muestras no reactivas consideradas negativos (figura 33).

Localidad	Positivos	Negativos
Estado de México	66	34
Jalisco	55	45
Veracruz	41	59
Total	162	138

Figura 33. **Relación de resultados en Dot-ELISA por estado.** Se encontró más de la mitad de las muestras en los estados de México y Jalisco con presencia de mancha mientras Veracruz solo se encontró 41 muestras con presencia de mancha.

Se realizó el cálculo de la frecuencia de positividad con el total de muestras con presencia de mancha.

Frecuencia de positividad

Presencia de mancha: $(162/300) \times 100 = 54\%$

6.5 Utilidad diagnóstica del Dot-ELISA

Con todos los datos obtenidos mediante ambas técnicas donde el WB es la prueba confirmatoria y el Dot-ELISA una prueba presuntiva, se construyeron dos tablas de contingencia (figura 34) para calcular la sensibilidad, especificidad y el índice *kappa* (figura 35 y figura 36) con respecto a la técnica de Dot-ELISA, mediante la relación que hubo de las muestras con 3 bandas reactivas y la relación de muestras con 1,2 o 3 bandas reactivas a los PES de *T. spiralis*.

Presencia de 3 bandas en WB

	Western blot		
Dot-ELISA	a	b	Total
	3	159	
	c	d	
	3	135	138
Total	6	294	300

Presencia de 1,2 o 3 bandas en WB

	Western blot		
Dot-ELISA	a	b	Total
	11	152	
	c	d	
	6	131	137
Total	17	283	300

Figura 34. **Tablas de contingencia para el cálculo de Sensibilidad, Especificidad e Índice kappa.** En la parte de arriba de cada tabla se colocó la prueba Estándar de oro (WB) y en la parte izquierda se colocó el Dot-ELISA como técnica a evaluar. El inciso **a** son los verdaderos positivos, el inciso **b** los falsos positivos, el inciso **c** los falsos negativos y el inciso **d** los verdaderos negativos.

Presencia de 3 bandas en WB	Porcentaje de Sensibilidad	$\frac{[a/(a+c)] \times 100}{(3/6) \times 100}$	50%
	Porcentaje de Especificidad	$\frac{[b/(b+d)] \times 100}{(135/294) \times 100}$	45.9%
Presencia de 1,2 o 3 bandas en WB	Porcentaje de Sensibilidad	$\frac{[a/(a+c)] \times 100}{(11/17) \times 100}$	64.7%
	Porcentaje de Especificidad	$\frac{[b/(b+d)] \times 100}{(131/283) \times 100}$	46.2%

Figura 35. **Resultados de la sensibilidad y especificidad con la presencia de mancha del Dot-ELISA con respecto a las muestras de WB.** Resultados con la presencia de 3 bandas en WB (parte superior), presencia de 1,2 o 3 bandas en WB (parte inferior).

Presencia de 3 bandas en WB

Kappa Observada	Error Estándar	Intervalo de confianza 0.95	
		Límite Inferior	Límite Superior
-0.003	0.015	-0.032	0.027

Kappa	Grado de acuerdo
< 0.00	Sin acuerdo
>0.00 – 0.20	Insignificante
0.21– 0.40	Discreto
>0.41– 0.60	Moderado
0.61– 0.80	Sustancial
0.81– 1.00	Casi perfecto

Presencia de 1,2 o 3 bandas en WB

Kappa Observada	Error Estándar	Intervalo de confianza 0.95	
		Límite Inferior	Límite Superior
0.022	0.024	-0.026	0.069

Kappa	Grado de acuerdo
< 0.00	Sin acuerdo
>0.00 – 0.20	Insignificante
0.21– 0.40	Discreto
>0.41– 0.60	Moderado
0.61– 0.80	Sustancial
0.81– 1.00	Casi perfecto

Figura 36. **Resultados de la concordancia entre la técnica de Dot-ELISA y el estándar de oro (WB).** Los resultados se obtuvieron mediante la aplicación en <http://graphpad.com/quickcalcs/kappa2/>. En la parte superior el resultado a presencia de 3 bandas en WB no tuvo acuerdo, mientras en la parte inferior el resultado a la presencia de 1,2 o 3 bandas en WB tuvo un acuerdo insignificante. Las tablas del lado derecho son las escalas de *kappa* propuestos por Landis y Koch (1977).

La sensibilidad (50%) y especificidad (45.9%) fueron muy similares ante las muestras de WB con 3 bandas, mientras que la sensibilidad (64.7%) y la especificidad (46.2%) con respecto a las muestras de WB con 1,2 o 3 bandas solo fue significativa en su sensibilidad con un incremento del 14.7% ante lo obtenido en las primeras condiciones mencionadas.

La concordancia en relación al WB con 3 bandas fue de -0.003 lo cual no generó ningún acuerdo, mientras al contar las muestras de 1, 2 o 3 bandas en el WB su valor fue de 0.022 con un grado de acuerdo insignificante debido a que mientras más lejos del valor 1.0 se considera que la concordancia es influenciada por el azar.

7. DISCUSIÓN

7.1 Obtención de larvas musculares y preparación de los productos de excreción y secreción

A partir de una dosis de infección de 7500 ± 25 larvas musculares (LM) por rata (peso 300 ± 10 g) se obtuvieron entre 360,000 y 401,500 LM. El índice de capacidad reproductiva (ICR) fue de 22 ± 5 LM. El rendimiento del antígeno de cada larva fue entre 0.0009 - 0.0018 μ g en relación a 10,000LM por cada 0.200mL de medio de cultivo; de esta manera se obtuvo una concentración de 158 ± 30 μ g/mL. La integridad del antígeno se comprobó mediante un gel de

poliacrilamida en condiciones reductoras donde se observaron las glicoproteínas de 45,49 y 55 kDa específicas de *Trichinella spiralis*.

Se ha descrito que el tiempo óptimo para la obtención de los productos de excreción/secreción se puede a las 18 horas en medio de cultivo en una relación de 5,000LM/mL en condiciones de CO₂ al 5%, recuperándose cada 24 h y filtrando en una membrana de 0.2 µm, llegando a una concentración de 2mg/mL (Rojas-Retiz, 1997), la diferencia en la obtención de los antígenos de excreción/secreción de este estudio con respecto a lo descrito por Rojas-Retiz (1997), consistió en la relación de larvas en el medio de cultivo considerándose el doble de lo descrito, pero disminuyendo la cantidad de medio 4 ± 1mL para que se obtuviera el antígeno más concentrado sin la necesidad de usar filtro ni hacer una liofilización para concentrarlo (Bien *et al.*, 2012) y recuperando el sobrenadante en intervalos de 48 h para promover una mayor liberación de PES al medio con alta reactividad para las pruebas empleadas.

Se han realizado PES empleándose ratones Balb/c como hospedadores aunque el uso de ratas por su tamaño y el número de individuos que se pueden emplear ha demostrado mejora de resultados en la recuperación de LM (Wang *et al.*, 2015), sin embargo las condiciones de recuperación de antígeno han mostrado reactividad cruzada que se ha corregido al obtener los antígenos bajo las mismas condiciones pero purificándolos a través de cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales que han sido sensibles y específicos en el serodiagnóstico de *Trichinella* en cerdos y caballos mediante ELISA (Viveros *et al.*, 2001).

Otro aspecto que ha destacado en el desarrollo de pruebas serológicas es el uso de beta tivelosa sintética, dado que esta libre de alfa tivelosa que corresponde a las enterobacterias como *E.coli*, *S. tiphymorium* y *Klebsiella spp* que son típicas en infecciones de equinos con sintomatología similar a la triquinelosis (Bruschi *et al.*, 2001).

Para mejorar las pruebas serológicas en caballo y evitar la reactividad cruzada (Gamble *et al.*, 2004) se puede considerar evaluar el tiempo que se mantienen estables los productos de excreción/secreción colocados en las membranas de nitrocelulosa tanto para inmunoelectrotransferencia como Dot-ELISA en intervalos de 6, 9 y 12 meses, comparando los resultados con muestras que presenten la infección a las enterobacterias mencionadas y empleando el antígeno sintético (Cervantes-Ladín *et al.*, 2014).

7.2 Prevalencia de anticuerpos contra *Trichinella* por Western blot

Al procesar los 300 sueros de caballos se encontró que 6 muestras (1 del Estado de México y 5 de Veracruz) fueron reactivas mediante el método de Western blot, donde se observó las 3 bandas específicas de los PES de *T. spiralis* (45, 49 y 55 kDa), mientras que 11 muestras bajo las mismas condiciones de trabajo presentaron una banda reactiva de 45 kDa; distribuidas en los tres grupos de cada estado 4 (Estado de México), 4 (Jalisco) y 3 (Veracruz). Considerando la frecuencia de positividad del total de muestras evaluadas ante la presencia de tres bandas específicas que solo se presentan en el género *Trichinella* (Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2005), el valor fue del 2% pero si se considera a todas las muestras esto es incluyendo las muestras con reactividad a una banda el valor de seroprevalencia sería de 5.6%. De manera particular, en caballos la prevalencia mediante técnicas serológicas ha sido de 3.5 al 7% considerando que se han empleado un número de caballos que oscila entre los 100 (México) hasta 5,000 (Rumania) animales evaluados (Yepez-Mulia *et al.*, 1999; Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2001) que son recibidos de diferentes regiones del país donde se ha hecho el seguimiento de animales infestados. De los tres estados de la República donde se ubicaron los ratos analizados, se ha reportado entre los años 1990 a 2016 casos de triquinelosis en humanos: Estado de México 44 personas, Jalisco 79 personas y Veracruz 81 personas (Datos de la Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud; México), hasta el

momento de las tres entidades se tiene como antecedente el trabajo de Salinas-Tobón *et al.* (1994) en un brote de Toluca, Estado de México donde 390 sueros humanos se encontró una frecuencia de positividad del 44% (Méndez-Loredo *et al.*, 2001).

La frecuencia serológica de caballos a nivel estatal ha sido del 7 al 17% en el Estado de México (Viveros *et al.*, 2001) considerando dos tipos de rastros municipal (sin certificación tipo TIF) y federal (con certificación tipo TIF) con un total de 170 caballos y solo 12 muestras de tejido por parte de Veracruz se comprobaron positivas mediante PCR (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2005), sugiriéndose en el caso del diagnóstico de triquinosis equina en fase crónica se debe emplear el PCR que a diferencia de las técnicas serológicas no conlleva reactividad cruzada (Bolas-Fernandez y del Corral Bezara, 2006), considerando que este estudio se realizó con la Proteína A como conjugado, con alta reactividad pudiendo reconocer no solo antígenos tivosados de *T. spiralis*, o bien pudiera reaccionar con los antígenos de la L1 de *Trichuris muris*, bajo las características antigénicas y posible agente infeccioso en el caballo. Los antígenos de respuesta lenta de 48kDa que se presentan como inmunodominantes durante todo el proceso de invasión muscular hasta después de los 40 días p.i que empieza a abatirse la respuesta (Ko *et al.*, 1994; Dea-Ayuela *et al.*, 2001), siendo solo Jalisco el único que no cuenta con datos sobre equinos.

Estudios previos han mostrado que la prevalencia de anticuerpos contra *Trichinella* puede ser de 1.5% considerando una población de 12,882 individuos de Chile y 19.1% con 1419 individuos de Laos en humano dependiendo cual fue la causa y sí es un país endémico (Contreras *et al.*, 2001; Conlan *et al.*, 2014), 0.47% en cerdo (Joshi *et al.*, 2005), alrededor de 0.2 al 10.7% en rata, perros y gatos (Stojcevic *et al.*, 2004; Miterpáková *et al.*, 2016) y 15 al 23.81%.

En animales de vida silvestre como son: felinos (leopardo, león, tigre, ocelote y puma), cánidos (zorro, coyote y lobo), prociónidos (coatí y mapache) y oso (Yépez-Mullia *et al.*, 1996; Hernández-Ortiz, 2016).

Al ser la glicoproteína de 45 kDa un epítipo inmunodominante en la respuesta inmune de la mayoría de hospedadores infectados por *Trichinella*, se ha considerado su papel en la triquinelosis crónica o secuelas posteriores a la infección debido a que es identificada a lo largo de la infección experimental por los anticuerpos del hospedador hasta los 42 días p.i. y se ha visto que esta glicoproteína se expresa en LRN en sus proteínas somáticas (Bruschi *et al.*, 2005; Salinas-Tobón *et al.*, 2007).

Debido a los resultados obtenidos en otros estudios en México, empleando tres métodos (Digestión, ELISA y PCR) con poblaciones que no sobrepasan los 200 individuos y sumándole una sola región estatal donde se han tomado las muestras (Estado de México) con poca información de su procedencia al momento de ser procesado el animal, por lo tanto es importante incrementar la cantidad de animales que se deseen evaluar para conocer la frecuencia de positividad a una escala multiestatal, ya que si la frecuencia de caballos infestados a nivel mundial no sobrepasa el 0.001% (Pozio y Zarlenga, 2005), esto no asegura realmente cuánta prevalencia se tiene en nuestro país, debido a la práctica de faenado clandestino y la conservación de animales de traspatio (Uribe-Gutiérrez, 2007).

7.3 Instrumentación del Dot-ELISA

La técnica de Dot-ELISA tuvo una diferencia de tiempo y bajo costo con respecto al procedimiento de Western blot (Maldonado-Tapia *et al.*, 2015), al evaluar las 300 muestras de suero se encontró que 162 de estas tuvieron reactividad ante los PES de *Trichinella spiralis* teniendo una frecuencia de positividad del 54%.

Al emplear el Dot-ELISA en otros modelos animales: rata (suero 1:800), ratón (suero 1:12800), cerdo (suero 1:6400) y caballo (suero 1:800) con la misma dilución de anti anticuerpo homólogo o Proteína A (1:2000), demostró que la reactividad de fondo puede estar presente tanto con anti anticuerpos específicos o mediante el uso de proteína A, exceptuando el modelo de rata donde la reacción se detiene hasta una dilución de suero 1:800, mientras que en el caballo se observó mayor intensidad en la reacción en algunas muestras a 1:800 y la mayor parte de las muestras conservaron una reacción de fondo a esa condición.

Al ser este el único reporte de Dot-ELISA en caballo se observó sí existía un límite en la reactividad de la reacción a altas diluciones de suero, ya que el uso del antígeno con PES de *Trichinella* fue constante en todos los modelos, siendo 5 µg por círculo de nitrocelulosa como lo describe Meza-Lucas *et al.* (2016), en donde se menciona que la cantidad que se coloca en este soporte es menor a lo que se maneja en las tiras de otros Dot blot. Se ha visto que empleando el soporte de tiras de nitrocelulosa, estas pueden contener un volumen de 1mL que equivale a 0.9mg de antígenos de extracto crudo de *Trichinella spiralis*, el cual se probó con 300 muestras de cerdo de traspatio en la dilución 1:100 (suero) y 1:2000 (conjugado anti cerdo) encontrándose 16 positivos, mismos que se confirmaron mediante Inmunoelctrotransferencia (IET) a las mismas condiciones de dilución del Dot-ELISA (Moreno-García *et al.*, 2012). Se han encontrado resultados del Dot-ELISA empleándose como tamiz con respecto a la técnica de Micro inmunodifusión (MID) en pacientes humanos (4,699 sueros), donde se considero el 10% de muestras (469 sueros) con 3 positivos en ambos métodos (Maldonado-Tapia *et al.*, 2015), pero con tremenda diferencia respecto a este trabajo.

Hay que considerar la modificación del Dot-ELISA evitándose con esto la reacción de fondo; modificando la dilución del antígeno (sugerido un rango de volumen para la dilución entre 0.1 a 0.2 mL), tiempo de bloqueo y observar resultados con otras soluciones de bloqueo distinta a la leche descremada (Li *et al.*, 2016).

7.4 Utilidad diagnóstica del Dot-ELISA

Al finalizar las pruebas de WB y Dot-ELISA, se comprobó la calidad del segundo método con respecto al primero dado que el WB permite apreciar un resultado específico con las bandas características del género *Trichinella* (45, 49 y 55 kDa) y el Dot-ELISA por la presencia de una mancha considerándole un resultado positivo donde se esperó que tuviera los mismos resultados, debido a que el procedimiento se diferenció al emplear los antígenos de excreción/secreción directamente en los círculos de nitrocelulosa, por lo tanto la sensibilidad fue de 50% (WB con 3 bandas) y 64.7% (WB de 1, 2 o 3 bandas), especificidad de 45.9% (WB con 3 bandas) y 46.2% (WB de 1, 2 o 3 bandas), por último el índice kappa (concordancia) fue de -0.003 sin grado de acuerdo (WB con 3 bandas) y 0.022 con un grado de acuerdo insignificante (WB de 1, 2 o 3 bandas).

La reacción de fondo en el Dot-ELISA así como el criterio para un resultado positivo en el Dot-ELISA (presencia o ausencia de mancha) pudieron ser un factor que influyo en los resultados estadísticos alterados, los cuales son necesarios para considerar la fiabilidad de los métodos empleados y disminuir un error en las variables en la presencia o ausencia del resultado esperado al momento de ser observados (Bossuyt *et al.*, 2003). Se ha reportado que cerdos con anticuerpos contra *Trichinella* han tenido resultados satisfactorios al encontrar la presencia de mancha bajo un criterio de exclusión mediante cruces, debido a su 100% de sensibilidad y 100% de especificidad en 22 muestras de suero, considerando la reacción de fondo como negativo (de una a dos cruces se considero negativo) y las muestras con una mancha intensa como positivas

comparándole contra un WB en el cual se empleó extracto crudo de LM (Aguilar-Figueroa *et al.*, 2000), mientras que la comparación entre el Dot-ELISA y la ELISA en muestras de suero humano con anticuerpos contra cisticercos con una sensibilidad de 56.25% y especificidad del 92% a partir de 100 muestras distribuidas en 4 grupos considerando la alta sospecha de una neurocisticercosis hasta en pacientes presuntamente sanos donde se empleó un antígeno de extracto crudo (Biswas *et al.*, 2004). En otro estudio donde se estandarizó el Dot-ELISA y se comparó con las técnicas de ELISA y WB para el diagnóstico de enfermedad de Chagas por *T. cruzi* empleando extracto antigénico en concentraciones de 0.25, 0.5 y 0.75µg/dot con una muestra ya caracterizada mediante ELISA, evaluándose 96 muestras previamente reconocidas como positivas en las dos técnicas mencionadas con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 89%, el mismo criterio de exclusión mediante cruces se planteo medida para descartar la reactividad cruzada, se finalizó con el cálculo del índice kappa con 249 muestras que tuvieron un índice kappa de 0.79 como un buen grado de concordancia a las técnicas de WB y ELISA (Cervantes-Landín *et al.*, 2014), aclarando que en este trabajo con caballos se decidió no emplear el sistema de exclusión con cruces debido a la apreciación visual del observador y se prefirió comparar los resultados con lo obtenido con el estándar de referencia (WB).

Para mejorar los parámetros estadísticos (sensibilidad, especificidad y concordancia) se puede considerar tanto la estabilidad del antígeno en el Dot-ELISA así como una concentración menor de antígeno y dado que obtuvieron controles positivos, emplear el conjugado homólogo al caballo (Flores *et al.*, 2012).

Esto es principalmente porque al usar el conjugado homólogo la reactividad de fondo pudiera considerarse no cruzada, debido a las características de los productos de excreción/secreción, por el tipo de enlace presente en su estructura siendo “beta” en *Trichinella* y “alfa” en bacterias como *E. coli*, *S.*

typhimorium y *Klebsiella spp* porque la estructura en las antenas de los residuos de GlcNAc y GalNAc de la tivelosa que constituyen anómeros al formar su estructura cíclica del monosacárido con un grupo hidroxilo que se orienta debajo del plano en los alfa, mientras el beta se encuentra sobre el plano de la estructura cíclica confiriendo una mayor respuesta ante los anticuerpos dirigidos a los azúcares , pudiendo ser la causa de la variabilidad en la prueba de ELISA, WB y el MID que son lo más empleado en serología ante la triquinelosis(Ellis *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2008).

En caso de considerarse la sospecha ante las bacterias mencionadas o algún otro nematodo común en los caballos, seria montar el método de WB y Dot-ELISA para comparar los resultados con dos conjugados (Proteína A y anti IgG de caballo), principalmente con los caballo que presentaron una banda de 45kDa en el WB y la mancha de baja intensidad en el Dot-ELISA dado que se debe disminuir el margen de error en este procedimiento ya que su sensibilidad y accesibilidad permite emplearse en estudios de campo (Tumino *et al.*, 2017; Cervantes-Ladín, 2014).

8. CONCLUSIONES

1. La presencia de anticuerpos específicos mediante inmunoelectrotransferencia fue del 2% en los 300 sueros analizados de los tres rastros, cinco muestras se encontraron en caballos de Veracruz y una muestra en caballos del Estado de México.
2. Se determinó por inmunoelectrotransferencia que el 5.6% de los sueros de caballo reaccionan con los productos de excreción y secreción de manera inespecífica, reconociendo una banda de 45 kDa.
3. La reactividad de los sueros de caballo por Dot-ELISA fue de 54%. La concordancia entre el Dot-ELISA y la Inmunoelectrotransferencia fue nula por índice kappa. La baja especificidad del Dot-ELISA y su considerable sensibilidad solo permite proponerla como una prueba para realizar un tamiz serológico.

9. PERSPECTIVAS

1. Relacionar los casos con reactividad inespecífica, evaluando las muestras ante antígenos producidos por bacterias (*E.coli*, *Klebsiella spp* y *S. typhimorium*) que generan sintomatología similar a la triquinelosis en el caballo.
2. El Dot-ELISA debe ajustar la cantidad de antígeno para evitar una reacción de fondo, dado que se consideró la homologación en otros estudios.
3. El diagnóstico de la triquinelosis equina debe evaluar si no presenta reacciones cruzadas con otros nematodos y enterobacterias que puedan afectar las pruebas serológicas.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Acha P.N. y Szyfres B, Editores. Triquinelosis. En: Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud 3ª ed. Washington, D.C. Publicación Científica y Técnica N° 580 2003; 3(Pt 3): p. 325-342.
2. Aguayo O.R, Méndez L.O, Medina F.J, Castillo R, Yépez M.L, Hernández L.F. *et al.* Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: insights from computational and experimental data. J. Mol. Graph. Model.2013; 41:12-19.
3. Aguilar F.B, Bautista G.C, Rojas J, de Nova M.E, Rodríguez O.I, Martínez G.F. Experimental Swine Trichinellosis: Use of Dot-ELISA and Western Blot with Excretion/Secretion Antigens (ES) from Infective Larvae to Detect Anti-*Trichinella spiralis* Antibodies. Rev. Latinoam. Microbiol. 2000; 42:57-62.
4. Almaraz M.G., Jaramillo A.C, Nicoli T.M. Identificación de especie animal como adulterante en chorizo, longaniza y carne para hamburguesa. Vet. Méx.1995; 26:139-140.
5. Altman D.G, Bland J.M. Diagnostic tests.1: Sensitivity and specificity. BMJ.1994; 308(6943):1552.
6. Ancelle T, Dupouy C.J, Desenclos J.C, Maillot E, Savage H.S, Charlet F. *et al.* A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France in 1993. Am J. Trop. Med. Hyg. 1998; 59(4):615-619.
7. Appleton J.A, Bell R.G, Hornan W, van Knapen F. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. Trends Parasitol.1991; 7(8):190-192.

8. Arjmand J, Esmailnejad B, Razi J.M, Ghorbanpoor M, Abtahi F.S. Designing and evaluation of Dot-ELISA for diagnosis of *Fasciola* infection in cattle. Vet. Res. Forum.2014; 5(2):141-144.
9. Arriaga-Díaz C, Yépez L, Ortega G. Avances y perspectivas en el diagnóstico de la Triquinelosis porcina. Cs. Vet.1994 (6):73-99.
10. Arriaga-Díaz C, Yépez L, Viveros N, Adame L.A, Zarlenga D.S, Lichtenfels J.R. *et al.* Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horse. J. Parasitol. 1995; 81:781-783.
11. Arriaga-Díaz C, Yépez L, Ortega G. Updates on equine Trichinellosis. Rev. Latinoam Microbiol. 1996; 38(2):139-150.
12. Arizmendi N, Yépez L, Fonseca R, Hernández B.R, Ortega G. Role of mast cells in the immune response to *Trichinella spiralis*. In: Terraza L.I, Editor. Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases.Kerela; 2007:p.165-182.
13. Barennes H, Sayasone S, Odermatt P, De Bruyne A, Hongsakhone S, Dupouy C.J. *et al.* A major trichinellosis outbreak suggesting a high endemicity of *Trichinella* infection in northern Laos. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2008; 78: 40-44.
14. Barr Richardson E. Aspects of *Trichinella spiralis* in New Zealand. [Thesis] Epidemiology at Massey University Palmerston North, New Zealand; 2006.
15. Barriga O. Inmunología de las infecciones parasitarias. En Atías A, Director. Parasitología Médica 3ª ed. Santiago de Chile: Editorial Mediterráneo; 2006. P 67-10.

16. Bartoloni A, Cancrini G, Bartalesi F, Nicoletti A, Méndez P.G, Rosado J. *et al.* Antibodies against *Trichinella spiralis* in the rural population of the Province of Cordillera, Bolivia. *Rev. Panam. Salud Pública.* 1999; 5(2):97-99.
17. Bartuliene A, Liausediene R, Motiejuniene V. Trichinellosis outbreak in Lithuania, Ukmerge region. 2009. *Euro Surveill.* 14; 5301-5310.
18. Beech R.N, Skuce P, Bartley D.J, Martin R.J, Prichard R.K, Gilleard J.S. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility? *Parasitology.* 2011; 138(2):160-174.
19. Berg J.M, Tymoczko J.L, Stryer L, Editores. Carbohidratos. En *Bioquímica* 6ª ed. España: Editorial Reverte; 2008. p. 319-344.
20. Berger S. Greek: Infectious Diseases of Greek. Gideno Informatics Inc. USA. 2015; pp 310.
21. Berger S. Georgia: Infectious Diseases of Georgia. Gideno Informatics Inc. USA. 2016; pp 268.
22. Berumen de la Torre V, Muñoz E.J, Moreno G.M. Trichinellosis in dogs from in Zacatecas, Mexico. *Parasitol. Latinoam.* 2002; 57(1-2):72-74.
23. Bien J, Näreaho A, Varmanen P, Gozdzik K, Moskwa B, Cabaj W, *et al.* Comparative analysis of excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* muscle larvae by two-dimensional difference gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteome Sci.* 2012; 10: 1-10
24. Biswas R, Parija S.C, Narayan S.K. Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2004; 46(5):249-252.

25. Blaga R, Cretu C.M, Gherman C, Draghici A, Pozio E, Nöckler K, *et al.* *Trichinella spp.* infection in horses of Romania: Serological and parasitological survey. *Vet. Parasitol.*2009; 159:285-289.
26. Boireau P, Vayssier M, Fabien J.F, Perret C, Calamel M, Soulé C.Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers.*Parasitology.*1997; 115:641-651.
27. Boireau P, Vallée I, Roman T, Perret C, Mingyuan L, Gamble H.R, *et al.* *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.* 2000; 93:309-320.
28. Bolás-Fernandez F, del Corral-Bezara L. TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of the potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res. Vet. Sci.*2006; 81: 297-303.
29. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Única de Información. Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud (DGE, SSA). 33(47) Semana 47. pp 3-10.
30. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Única de Información. Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud (DGE, SSA). 33(52) Semana 52. pp 34.
31. Borchgrave J, de Geerts S, Buyse F, van Knapen F. Does trichinellosis occur in horses in Belgium. *Vlaams Diergen. Tijdschrift.* 1991; 60:185-186.
32. Bossuyt P.M, Reitsma J.B, Bruns D.E, Gatsonis C.A, Glasziou P.P, Irwig L.M. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin. Chem.* .2003; 49:7-18.

33. Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248-254.
34. Bravo Grau S, Cruz Q J.P. Estudios de exactitude diagnóstica: Herramientas para su interpretación. *Rev. Chile. Radiol.* 2015; 21(4):158-164.
35. Bruschi F, Moretti A, Wassom D, Piergili F.D. The use of synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite.* 2001; 8:S141-S143.
36. Bruschi F. The immune response to the parasitic nematode *Trichinella* and the ways to escape it. From experimental studies to implications for human infection. *Current Drug Targets Immune Endocr Metabol. Disord.* 2002; 2(3): 269-280.
37. Bruschi F. Focus on Immunology of Trichinellosis. *Med. Chem. Rev.* 2004; 1(2): 179-185.
38. Bruschi F, Locci M.T, Cabaj W, Moskwa B, Castagna B, Kociecka W, *et al.* Persistence of reactivity against the 45KDa glycoprotein in late trichinellosis patients. *Vet. Parasitol.* 2005; 132:115-118.
39. Bruschi F, Korenaga M, Watanabe N. Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? *Trends in Parasitol.* 2008; 24(10): 462-467.
40. Bruschi F, Dupouy C.J. Trichinellosis. In Bruschi F. editor. *Helminth Infections and Their Impact on Global Public Health.* Springer,-Vienna. 2014. P 229, 273.

41. Bura M.W.T, Willet W.C. An outbreak of trichinosis in Tanzania. East Afr. Med. J. 1977; 54(4): 185-193.
42. Campbell W.C. Trichinosis revisited-another look at modes of transmission. Parasitology Today.1988; 4:83-86.
43. Caraballo L, Zakzuk J. Consideraciones sobre la evolución de la respuesta inmunitaria Th2 y sus posibles relaciones con parasitosis y alergia. Biomédica. 2012; 32:145-157.
44. Cardoen S, Berkvens D, Claes L, Van gucht S, Dewulf J, deZutter L, *et al.* Evaluation du risque vis-à-vis des parasites du genre *Trichinella* in Belgique: état des lieux et perspectives. Ann. Med. Vet. 2010; 154:30-47.
45. Catelli J.L. El caballo en Europa para producción de carne. Veterinaria Argentina.2004; 21(205):364-368.
46. Celano G.V, Cafarchia C, Pozio E, Pavia C, Casolino A, CApriulo G, *et al.* First report in Italy of *Trichinella sp.* Larvae in horse meat. Industrie Alimentari. 1996; 35:1311-1313.
47. Cervantes Ladín A.Y, Martínez-Martínez I, Reyes P.A, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. Estandarización de la técnica de Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. Enf. Infec. Microbiol. Clin. 2014; 32(6):363-368.
48. Cervantes Vázquez R. Incidencia de *Trichinella spiralis* en cerdos sacrificados en los rastros Municipal y Reforma Agraria de la ciudad de Oaxaca y su posible repercusión en la población humana. [Tesis] Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Cuautitlán, Estado de México; 1993.

49. Chávez Guajardo E, Saldivar E.S, Muñoz E.J, Moreno G.M. Trichinellosis una zoonosis vigente. Rev. Elec. Vet. 2006; 8(5):1-19.
50. Chomel B.B, Kasten R, Adams C, Lambillote D, Theis J, Goldsmith R, *et al.* Serosurvey of some major zoonotic infections in children and teenagers in Bali, Indonesia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 1993; 24(2):321-326.
51. Chung M.S, Joo K.H, Quan F.S, Kwon H.S, Cho S.W. Efficacy of Flubendazole and Albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. Parasite. 2001; 8:S195-198.
52. Conlan J.V, Vongxay K, Khamlome B, Gómez M.M, Pozio E, Blacksell S.D, *et al.* Patterns and risks of *Trichinella* infection in humans and pigs in northern Laos. PLoS Negl. Trop. Dis. 2014; 8(7): 1-10.
53. Contreras M.C, Sandoval L, Salinas P, Saavedra T, Schenone H. Inmunodiagnóstico de la triquinosis humana. Bol. Chil. Parasitol. 2001; 56(3-4):1-6.
54. Coria Paredes D.M. Evaluacion del efecto del albendazol y del derivado bencimidazólico GNV-14 sobre el citoesqueleto de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. [Tesis]. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F; 2014.
55. Corradi P, Del Río J.A, Eleicegui G, Zorraquin T. Equinos. En: Agroalimentos Argentinos II. Zorraquin T, editor. Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola [AACREA]. Buenos Aires; 2005. p. 231-238.

56. Correa Beltrán D, Naro R.J., De la Rosa J, Ortega P.G. Trichinellosis: An Overview of Research in Mexico: 1891-1996. In: Trichinellosis ICT9 (Ortega Pierres M.G., Gamble H.R., van Knapen F. and D. Wakelin, eds). México: Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional México. 1997. P.1-7.
57. Correa Beltrán D, Coballase U.E, Solís R.D, Huerta G.B, Hernández J.L. Triquinelosis. En Flisser A, Pérez R, Editores. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. 1ªed. México: Editores textos mexicanos; 2006. P 560-570.
58. Cortés B.M, García C.A, Guerra P.F, Ramos A.J, Herrera D, Martínez N.F. Brote de triquinosis en Cáceres, España, Diciembre de 2001-Febrero de 2002. Euro Surveill. 2002; 7(10).
59. Cruz A, Camargo B, editores. Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines. 1ª ed. México: Editorial Plaza y Valdés; 2001.
60. Dea Ayuela M.A, Bolas-Fernández F. *Trichinella* antigens: a review. Vet. Res.1999; 30(6):559-571.
61. Dea Ayuela M.A, Romarís F, Ubeira F.M, Rama I.S, Martínez-Fernández A.R, *et al.* Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embrionated eggs of several nematodes. Parasite. 2001; 8:120-122.
62. De la Rosa J, Aranda J.G, Padilla E, Correa D. Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. Int. J. Parasitol. 1998; 8(2):317-321.

63. De la Rosa J, Álvarez N, Gómez P.A. Study of reproductive capacity of *Trichinella spiralis* recovered from experimentally infected mice under-dosed with albendazole or mebendazole. Trop. Biomed.2007; 24(2):93-94.
64. De la Rosa J, Gomez P.A. Triquinelosis.En Becerril Flores M.A, Editor. Parasitología Médica 2ª ed.México: Mc Grawhill. 2008. P. 208-214.
65. De la Rosa J.Inducción de inmunidad protectora tipo Th1 en la triquinelosis experimental murina. [Tesis doctoral]. Escuela Superior de Medicina, IPN. México D.F;2012
66. De la Rosa J. Triquinoscopía y digestión artificial en tejido para el diagnóstico de *Trichinella*. En Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal [CONASA]. 2015:461-470.
67. Denkers E.Y, Hayes C.E, Wassom D.L. *Trichinella spiralis*: Influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinan on the host antibody response repertoire.Exp. Parasitol.1991.72:403.
68. Devleeschauwer B, Praet N, Speybroeck N, Torgerson P.R, Haagsma J.A, De Smet K, *et al.* The low global burden of trichinellosis: evidence and implication. Int. J. Parasitol. 2015; 45:95-99.
69. Díaz C.C, Plaza C.E, Chimoy E.P. Niveles séricos de Triglicéridos y Colesterol en caballos peruanos de paso bajo dos sistemas de crianza.Rev. Inv. Vet. Perú.2008; 19(2):134-139.

70. Dixon H, Blanchard C, de Schoolmeester M, Yuill N, Christie J, Rothenberg M, *et al.* The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastro intestinal mucosa during helminth infection. *Eur J. immunol.* 2006; 36: 1753-1763.
71. Dupouy C.J, Soulé C, Ancelle T. Recent news on trichinellosis: another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite.* 1994; 1:99-103.
72. Dupouy C.J, Murrell K, Boireau P, Bruschi F, Gamble H.R, Pozio E, *et al.* FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), World Organization for Animal Health (OIE), 2007; 1-119.
73. Dupouy C.J, Lecam S, Talabani H, Ancelle T. Trichinellosis acquired in Senegal from warthog ham. *Euro. Surveill.* 2009; 14(21):pii 19220
74. Dupouy C.J, Yera H, Dahane N, Bouthry E, Kapel M.O. A cluster of three cases of trichinellosis linked to bear meat consumption in the Arctic. *J. Travel Med.* 2016; 23(5).
75. Ellis L.A, McVay C.S, Probert M.A, Zhang J, Bundle D.R, Appleton J.A. Terminal beta-linker tyvelose creates unique epitopes in *Trichinella spiralis* glycan antigens. *Glycobiology*, 1997; 7(3):383-390.
76. Faber M, Schink S, Mayer S.A, Ziesch C, Schönfelder R, Wichmann S.H, *et al.* Outbreak of trichinellosis due to wild boar meat and evaluation of the effectiveness of post exposure prophylaxis, Germany, 2013. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 60:98-104.

77. Fabregas X, de Benito J. *Trichinella*: Epidemiología y nuevas perspectivas de inspección sanitaria en carne de equino (I). Eurocarne, España. 2001; 94:1-9.
78. Fabregas X. Producción. Calidad y Consumo de carnes equinas en España. Eurocarne.2002. (110).
79. Fabre M.V, Beiting D.P, Bliss S.K, Appleton J.A. Inmunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. Vet. Parasitol. 2009; 159:245-248.
80. Faostat. FAO Statistical Pocketbook 2015. World food and agriculture 2015. pp. 29, 30, 59, 57, 85, 129, 133, 154, 155, 178.
81. Feinstein A.R, Cicchetti D.V. High agreement but low kappa: I. the problems of two paradoxes. J Clin Epidemiol 1990; 43: 543-549.
82. Flores Amézquita L. 2000. Enfermedades Zoonoticas prevalentes en Jalisco reportadas en humanos del año 1993 a 1997. [Tesis] Universidad de Guadalajara.Las Agujas Nextipac, Zapopan, Jalisco. México; 2000.
83. Flores C.M, Cruz I, Nieto J, Gárate T, Navarro M, Pérez A.A, *et al.* Sensitivity and Specificity of an Operon Immunochromatographic Test in serum and whole-blood samples for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in Spain, an area of nonendemicity. Clin. Vaccine Immunol. 2012; 19(9):1353-1359.
84. Gaddam R, GSS M, Kommu S. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of ovine oesophagostomosis. J. Parasitic Dis. Diagnosis and Therapy. 2016; 1(1):1-8.

85. Gajadhar A, Pozio E, Gamble H.R, Nöckler K, Maddox H.C, Forbes L.B, *et al.* *Trichinella* diagnostics and control: mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet. Parasitol.* 2009; 159(3-4):197-205.
86. Gallardo M.T, Mateos L, Artieda J, Wesslen L, Ruiz C, García M.A, *et al.* Outbreak of trichinellosis in Spain and Sweden due to consumption of wild boar meat contaminated with *Trichinella britovi*. *Euro. Surveill.* 2007; 12(3): E070315.1.
87. Gamble H.R, Bush E. 1998. Seroprevalence of *Trichinella* infection in domestic swine based on the National Animal Health Monitoring System's 1990 and 1995 swine survey. *Vet. Parasitol.* 1999; 80(4): 303-310.
88. Gamble H.R, Bessonov S.A, Cuperlovic K, Gajadhar A, van Knapen F, Nöckler K, *et al.* International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 2000; 93:393-408.
89. Gamble H. R, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel M.O, Gajadhar A. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological test for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite.* 2004; 11:3-13.
90. García E, Mora L, Torres P, Jercic M.I, Mercado R. First record human trichinosis in Chile associated with consumption of wild boar (*Sus scrofa*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2005; 100:17-18.
91. Gelal F, Kumral E, Vidinli B.D, Erdogan D, Yucel K, Erdogan N. Diffusion – weighted and conventional MR imaging in neurotrichinosis. *Acta Radiol.* 2005; 46(2):196-199.

92. Gómez de Anda F. Factibilidad de detección de *Trichinella spiralis* en carne por clasificación de analogía espectral (SIMCA). [Tesis doctoral] Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México D.F; 2012.
93. Gómez García V, Hernández-Quero J, Rodríguez-Osorio M. Short report: Human infection with *Trichinella britovi* in Granada, Spain. *Am. J Trop. Med. Hyg.* 2003; 68(4):463-464.
94. Gómez Morales M.A, Mele R, Sánchez M, Sacchini D, De-Giacomo M, Pozio E. Increased CD8(+)-T-Cell expression and a Type 2 cytokine pattern during the muscular phase of *Trichinella* infection in humans. *Infect. Immun.* 2002; 70: 233-239.
95. Gómez Morales M.A, Selmi M, Ludovisi A, Amanti M, Fiorentino E, Breviglieri L, *et al.* Hunting dogs as sentinel animals for monitoring infections with *Trichinella spp.* In wildlife. *Parasit. Vectors.* 2016; 9(154):1-11.
96. Gómez Priego A, Crecencio R.L, de la Rosa J. Serological evaluation of thin-layer immunoassay-enzyme-linked immunosorbent assay for antibody detection in human trichinellosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000; 7:810-812.
97. Gorman N.T, Halliwell R.E, Editors. *Veterinary clinical Immunology.* Philadelphia, U.S.A: Saunders and Co; 1989.
98. Gottstein B, Pozio E, Nockler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control of Trichinellosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22:127-145.
99. Greenbloom S.L, Martin S.P, Isaacs S, Marshall B, Kittle D.C, Kain K.C, *et al.* Outbreak of trichinosis in Ontario Secondary to the ingestion of wild boar meat. *Can. J. Public Health.* 1997; 88(1):52-56.

100. Grecnis R.K, Hültner L, Else K.J. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology*. 1991; 74(2): 329-332.
101. Gurish M.F, Humbles A, Tao H, Finkelstein S, Boyce J, Craig G, *et al.* CCR3 is required for tissue eosinophilia and larval cytotoxicity after infection with *Trichinella spiralis*. *J. Immunol*. 2002; 168(11): 5730-5736.
102. Hadas E, Rodríguez-Caaveiro F, González-Amparo J. Oxidant defence enzymes in different isolates of *Trichinella*. *Acta Parasitol*. 1994; 39(1): 32-36.
103. Haim M, Efrat M, Wilson M, Schantz P.M, Cohen D, Shermer J. An outbreak of *Trichinella spiralis* infection in southern Lebanon. *Epidemiol. Infect.* 1997; 119(3): 357-362.
104. Helmbly H, Grecnis R.K. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-gamma during *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol*. 2002; 169(5): 2553-2560.
105. Helms C.H, Allen P.Z. Studies on equine Immunoglobulins. II: Antigenic interrelationships among IgG, IgG (T) and antipneumococcal gamma1-component. *J. Immunol*. 1970; 105: 1253-1263.
106. Hernández M, Ramos M.E, Casco S.E, Morales G.J, Perez M.E. Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chih. Diagnóstico por compression tisular y tinción. *Gaceta Med. Méx.* 1992 128: 45-50.

107. Hernández Ortiz A. Estudio epidemiológico de *Trichinella spp* y *Toxoplasma gondii* en poblaciones de proclónidos y animales sinantrópicos de Tabasco, México. [Tesis] Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.; 2016.
108. Hernández Vargas K.M. Papel de la dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la infección aguda por el nemátodo parásito *Trichinella spiralis*. [Tesis] Facultad de Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.; 2016.
109. Hill D.E, Forbes L, Gajadhar A, Gamble H.R. Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue. *Vet. Parasitol.* 2007^a; 146(1-2):102-106.
110. Hill D.E, Forbes L, Kramer M, Gajadhar A, Gamble H.R. Larval viability and serological response in horses with long-term *Trichinella spiralis* infection. *Vet. Parasitol.* 2007^b; 146:107-116.
111. Järvis T, Miller I, Pozio E. Epidemiological studies on animal and human trichinellosis in Estonia. *Parasite.* 2001; 8(2S):S86-S87.
112. Jeong J.T, Seo M, Hong S.T, Kim Y.K. An outbreak of trichinellosis by consumption of raw soft-shelled turtle meat in Korea. *Korean J. Parasitol.* 2015; 53(2): 219-222.
113. Jiménez Cardoso E, Caballero-García M.L, Uribe-Gutiérrez G. Frecuencia de *Trichinella spiralis* en sangre y músculo de equinos sacrificados en dos diferentes mataderos, uno de tipo industrial y otro de tipo rural en el Estado de México. *Vet. Méx.* 2005; 36(3):269-278.

114. Joshi D.D, Moller L.N, Maharjan M, Kapel C.M. Serological evidence of trichinellosis in local pigs of Nepal. *Vet. Parasitol.* 2005; 132(1-2):155-157.
115. Kaewpitoon N, Kaewpitoon S.J, Philipsri C, Leksomboon R, Maneenin C, Sirilaph S, *et al.* Trichinosis: epidemiology in Thailand. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12:6440-6445.
116. Kapel C.M. Sylvatic and domestic *Trichinella spp.* In wild boars; infectivity muscle larvae distribution, and antibody response. *J. Parasitol.* 2001; 87(2):309-314.
117. Kellam L, Johnson P, Kramer J, Keegan K. Gastric impaction and obstruction of the small intestine with persimmon phytobezoars in a horse. *J. the Am. Vet. Med. Assoc.* 2000; 216(8):1279-1281.
118. Kennedy M.W, Harnett W, Editors. *Parasitic Nematodes Molecular Biology, Biochemistry and Immunology.* CABI Publishing, UK; 2001.
119. Kennedy E.D, Hall R.L, Montgomery S.P, Pyburn D.G, Jones J.L. Trichinellosis Surveillance United States 2002-2007. Centers for Disease Control & Prevention (CDC). 2009; 58(SS9):1-8.
120. Kim G, Choi M.H, Kim J.H, Kang Y.M, Jeon H.J, Jung Y, *et al.* An outbreak of trichinellosis with detection of *Trichinella* larvae in leftover wild boar meat. *J. Korea Med. Sci.* 2011; 26: 1630-1633.
121. Ko R.C, Fan L, Lee D.L, Compton H. Changes in host muscles induced by excretory/secretory products of larval *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitology.* 1994; 108:195-205.

122. Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.* 2000; 93: 365-383.
123. Kouam M.K, Diakou A, Kanzoura V, Papadopoulos E, Gajadhar A, Theodoropoulos G. A seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids Greece and analysis of risk factors. *Vet. Parasitol.* 2010; 170(1-2): 170-175.
124. Knight P.A, Wright S.H, Lawrence C.E, Paterson Y.M, Miller R.P. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J. Exp. Med.* 2000; 192(2): 1849-1856.
125. Krivokapich S.J, Molina V, Bergagna H.F, Guarnera E.A. Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic synanthropic and sylvatic animals from Argentina. *J. Helminthol.* 2006; 80(3):267-269.
126. Kurdova R, Muller N, Tsvetkova N, Michov L, Georgieva D, Ivanova D. *et al.* Characterisation of *Trichinella* isolates from Bulgaria by molecular typing and cross-breeding. *Vet. Parasitol.* 2004; 123(3-4):179-188.
127. Kusolsuk T, Kamonrattanakun S, Wesanonthawech A, Dekumyoy P, Thaenkham U, Yoonuan T, *et al.* The second outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella papue* in Thailand. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2010; 104(4):433-437.
128. Landis J.R, Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33: 159-174.

129. Latimer K.S, Mahaffey E.A, Prasse K.W, Editores. Hígado. En Duncan & Prasse's Patología Clínica Veterinaria 4ª ed, España: MultiMedica Ediciones Veterinarias.2005; P. 244-249.
130. Lechner A, Kraus J, Hoppe U.C, Glawischnig W, Auer H, Allerberger F. Outbreak of human trichinellosis. Austria 2010. Wiener tierärztliche monatsschrift Vet. Med. Austria. 2012; 92(12):288-294.
131. Li C.K.F, Ko R.C. Inflammatory response during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. Parasitol. Res. 2001; 87(9): 708-714.
132. Li C.M, Miao Y, Lingeman R.G, Hickey R.J, Malkas L.H. Partial Purification of a Megadalton DNA Replication Complex by Free Flow.PLoS One. 2016; 11(12): 1-20.
133. Liciardi M, Marucci G, Addis G, Ludovisi A, Gómez-Morales M.A, Deiana B, et al. *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* mixed infection in a horse from Poland. Vet. Parasitol. 2009; 161(3-4): 345-348.
134. Littman M, Nöckler K, Hallauer J. Cluster of trichinellosis cases in Mecklenburg-Vorpommern, Germany. Euro. Surviell. 2006; 11(20):E060518.1.
135. Liu M, Boireau P. Trichinellosis in China: epidemiology and control. Trends Parasitol. 2002; 18:553-556.
136. Lo Y.C, Hung C.C, Lai C.S, Wu Z.Q, Nagano I, Maeda T, et al. Human trichinosis after consumption of soft-shelled turtles, Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 2009; 15(12):2056-2058.

137. Maldonado Tapia C, Reveles H.R, Saldivar E.S, Muñoz E.J., Morales V.M, Moreno G.M. Evaluación del efecto protector de 2 inmunogenos de *Trichinella spiralis* en ratas Long Evans con modificación nutricional e infectado con *Trichinella spiralis*. Archivos Farmacol. Terap. Soc. Venezolana. Farmacol Clin. Terap. Ven. 2007; 2:110-114.
138. Maldonado Tapia C, Bracamontes M.N, López B.S, Muñoz E.J, Chávez G.E, Moreno G.A. Anti-*T.spiralis* Antibodies Detection in some Localities of Zcatecas (México). Int. Arch. Med. 2015; 8(216): 1-6.
139. Martínez González J, Jiménez G.A, Rodríguez-Caabeiro F. Purification of *Trichinella spiralis* tubulin: comparison of several analytic procedures. Vet. Parasitol.1998; 77(2-3):115-121.
140. Martínez Fernández A. Triquinelosis. En: Cordero M, Rojo F, Martínez A.R, et al, Editores. Parasitología Veterinaria: McGraw-Hill. Interamericana.1999; 496-506.
141. Medina Lerena M.S. Determinación experimental de la viabilidad de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo sometida a diferentes condiciones de manejo y conservación. [Tesis] Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Las Agujas Nextipac. Zapopan, Jalisco; 2007.
142. Medina Lenera M.S, Ramirez A.A, Kühne M, Gómez-Priego A, de la Rosa J. Influence of different processing procedures on the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* in pork meat. Trop. Anim. Health Prod. 2009; 41(4):437-442.

143. Méndez Loredó B, Martínez y Zamora R, Chapa R.R, Salinas-Tobón M.R. Class specific antibody responses to newborn larva antigens during *Trichinella spiralis* infection. *Parasite*. 2001; 8: S152-S157.
144. Meng X, Lindsay D, Sriranganathan N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philos. Trans. R. Soc. B. Lond. B.Biol. Sci.* 2009; 364(1530): 2697-2707.
145. Messiaen P, Forier A, Vanderschueren S, Theunissen C, Nijs J, Van Esbroeck M, *et al.* Outbreak of Trichinellosis related to eating imported wild boar meat. Belgium, 2014. *Eurosurveillance* 2016; 21(37):2-9.
146. Meza Lucas A, Pérez Villagómez M.F, Martínez López J.P, García Rodea R, Martínez-Castelán M.G, Escobar Gutiérrez A, *et al.* Comparison of Dot-ELISA and Standart-ELISA for Detection of the *Vibrio cholera* Toxin in Culture Supernatants of Bacteria Isolated from Human and Environmental Samples. *Indian J. Microbiol.* 2016; 56(3):379-382.
147. McAuley J.M, Michelson M.K, Schantz P.M. Trichinosis surveillance, United States, 1987-1990 Morbidity and mortality weekly report: Surveillance summaries Center for Disease Control & Prevention (CDC). 1991; 40(SS-3):35-42.
148. McDermott J.R, Bartram R.E, Knight P.A, Miller H.R, Garrod D.R, Grencis R.K. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. of the Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100 (13): 7761-7766.
149. McGuire T.C, Crawford T.B. Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. *Am. J. Vet. Res.* 1973; 34(10): 1299-1303.

150. Mcvay C.S, Tsung A, Appleton J. Participation of Parasite Surface Glycoproteins in Antibody-Mediated Protection of Ephemeral Cells against *Trichinella spiralis*. Infect. Immun.1998; 66(5):1941-1945.
151. Milne L.M, Bhagani S, Bannister B.A, Laitner S.M, Moore P, Eza D, *et al*. Trichinellosis acquired in the United Kingdom. Epidemiol. Infect. 2001; 127(2):359-363.
152. Miterpáková M, Antolova D, Hurnikova Z, Brezinova N. Seroprevalence of *Trichinella* infections in domestic dogs from Slovakia. J. Helmitol. 2016; 29:1-6.
153. Molina G.Z, Galaviz S.L. *Trichinella spiralis*: Triquinosis, Triquiniasis. En Rodríguez Pérez E.G, Editor. Parasitología Médica 1ª edición, Editorial Manual Moderno. 2013. P. 269-280.
154. Moller L.N, Petersen E, Kapel C.M, Melbye M, Koch A. Outbreak of trichinellosis associated with consumption of game meat in West Greenland. Vet. Parasitol. 2005; 132(1-2): 131-136.
155. Monroy H, Flores-Trujillo M, Benitez E, Arriaga-Díaz C. Swine Trichinellosis in Slaughterhouse of the metropolitan area of Toluca. Parasite. 2001;8:S249-S251
156. Monter Villareal M. Evaluación “*in vivo*” de la actividad biológica de la actividad biológica de derivados benzimidazólicos contra la fase enteral de *Trichinella spiralis*. [Tesis]. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Tlanepantla, Estado de México; 2008.

157. Moorhead A, Grunenwald P.E, Dietz V.J, Schantz P.M. Trichinellosis in the United States, 1991-1996: Declining but not gone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(1): 66-69.
158. Morelle W, Haslam S.M, Morris H.R, Dell A. Characterization of the N-linked glycans of adult *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; 109(2): 171-177.
159. Moreno García M.A, Rivas G.J, Berumen V, Muñoz E.J. Detección de *Trichinella spiralis* en rata doméstica del basurero Municipal de Zacatecas. *Rev. Elec. Vet.* 2007; 8(5):1695-7504.
160. Moreno García M.A, Maldonado Tapia C, Chávez R.I, Reveles R.G, Quiroz N.Z, Muñoz J. El estudio de *Trichinella spiralis* en modelos experimentales. *Rev. Elec. Vet.* 2012; 13(7):1-12.
161. Morfin B.M, Castillo B.M. Efectos inmunomodulares de la célula cebada. *Alerg. Asma Inmunol. Pediat.* 2009; 18(2): 47-51.
162. Murrell K. D, Bruschi F. Trichinellosis, in: *Progress in Clinical Parasitology*. Sun T, Editor: CRC Press. Boca Ratón, USA; 1994. P. 117-150.
163. Murrell K.D, Djordjevic M, Cuperlovic K, Sofronic Lj, Savic M, Djorfjevic M, *et al.* Epidemiology of *Trichinella* infection in the horse: the risk from animal product feeding practices. *Vet. Parasitol.* 2004; 123:223-233.
164. Murrell K.D, Pozio E. Worldwide Occurrence and Impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12):2194-2202.

165. Nagano I, Wu Z, Boonmars T, Takahashi Y. Molecular cloning and characterisation of two kinds of proteins in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis*. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34(4):491-500.
166. Nachon-Cicciarella H.N, Bosisio C.R. Enfermedades infecciosas de los equinos. Area de Salud y Producción de Equinos 2ª ed. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires; 2005.
167. Nanev V, Gabrashanka M, Petkova S, Tepavitcharova S, Hrusanov D, Dilcheva V, *et al.* Oxidant/Antioxidant status in infected with *Trichinella spiralis* mice after zinc supplementation. *Con. Res. People Actual Tasks on Multidisciplin. Sci. At Lozenec, Bulgaria.* 2011; 3(8-10); 203-207.
168. Neghina R, Neghina A.M, Marincu I, Iacobiciu I. Reviews on trichinellosis (I): renal involvement. *Foodborne Pathol Dis.* 2011; 8(2):179-188.
169. Negrão-Corrêa D. Importance of Immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: Looking at the intestinal mucosae. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 2001; 43(5): 291-299.
170. Nezri M, Ruer J, De B.A, Cohen V.R, Pozio E, Dupouy C.J. First report of human case of trichinellosis due to *Trichinella britovi* after jackal (*Canis aureus*) meat consumption in Algeria. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2006; 99(2): 94-95.
171. Norma Oficial Mexicana, NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.

172. Nöckler K, Voigt W.P, Protz D, Miko A, Ziedler K. Indirect ELISA for diagnosis of trichinellosis in living pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr.1995;108(5):167-174.(In Germany)
173. Nöckler. K, Pozio E, Voigt W.P, Hendrich J. Detection of *Trichinella* infection in food animals. Vet. Parasitol.2000; 93(3-4):335-350.
174. Nöckler K, Hamidi A, Fries R, Heidrich J, Beck R, Marinculic A. Influence of Methods for *Trichinella* Detection in pigs from endemic and non-endemic European region. J. Vet. Med. 2004; 51(6):297-301.
175. Nöckler K, Serrano-Aguilera F.J, Boireau P, Kapel M.O, Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in diferent diagnostic matrices. Vet. Parasitol. 2005; 132(1-2):85-90.
176. Ocadiz García J, Editor. Triquinelosis. En Epidemiologia en animales domesticos: control de enfermedades: Editorial Trillas México.1999; p. 170,171.
177. Odelram H. A trichinosis epidemic. Scand. J. Infect. Dis. 1973; 5(4):293-298.
178. Olaison L, Ljungström I. An outbreak of trichinosis in Lebanon. Trans. the R. Soc. Trop. Med. Hyg.1992; 86:658-660.
179. Ortega Pierres G, Yépez L, Homan W, Gamble H.R, Takahashi Y, Wassom D. L, *et al.* Workshop on detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a plataform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunol. 1996; 18:273-284.
180. Ortega Pierres G, Arriaga-Díaz C, Yépez L. Epidemiology of Trichinellosis in Mexico, Central and South America. Vet. Parasitol. 2000; 93:201-225.

181. Ouyang W, Löhning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radruch A, *et al.* Stat-6 independent GATA-3 autoactivation directs IL-4 independent Th2 development and commitment. *Immunity*. 2000; 12:27-37.
182. Oivanen L. Endemic trichinellosis-experimental and epidemiological studies. Natl Vet. Food Res. Inst. Helsinki, Finland. 2005; P: 32.
183. Ozeretskovskaya N.N, Mikhailova L.G, Sabgaida T.P, Dovgalev A.S. New trends and clinical patterns of human trichinellosis in Russia at the beginning of the XXI century. *Vet. Parasitol.* 2005; 132:167-171.
184. Parra D, Takizawa F and Oriol-Sunyer J. Evolution of Cell Immunity. *Annu Rev. Anim. Biosci.* 2013; 1:65-97.
185. Pozio E, Varese P, Morales M.A, Croppo G.P, Pelliccia D, Bruschi F. Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 48(4):568-575.
186. Pozio E, Tamburrini A, Sacchi L, Gómez-Morales M.A, Corona S, Goffredo E, *et al.* Detection of *Trichinella spiralis* in horse during routine examination in Italy. *Int. J. Parasitol.* 1997; 27(12):1613-1621.
187. Pozio E, Paterlini F, Pedarra C, Sacchi L, Bugarini R, Goffredo E. *et al.* Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horse. *J. Helminthol.* 1999; 73:233-237.
188. Pozio E. Factors affecting the flow among domestic synanthropic and silvatic cycles of *Trichinella*. *Vet. Parasitol.* 2000; 93 (3-4): 241-62.

189. Pozio E, Sacchini D, Sacchi L, Tamburrini A, Alberici F. Failure of mebendazole in the treatment of human with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae. Clin. Infect. Dis. 2001; 149(1-2): 3-21.
190. Pozio E. New patterns of *Trichinella* infection. Vet. Parasitol. 2001; 98:133-148.
191. Pozio E, Sofrocnic-Milosavljevic L, Gomez-Morales M.A, Boireau P, Nöckler K. Evaluation of ELISA and Western blot analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. Vet. Parasitol. 2002; 108(2):163-178.
192. Pozio E, Zarlenga D.S. Recent advances on the taxonomy, systematic and epidemiology of *Trichinella*. Int. J. Parasitol. 2005; 35:1191-1204.
193. Pozio E. World distribution of *Trichinella spp.* Infections in animals and humans. Vet. Parasitol. 2007; 149(1-2):3-21.
194. Pozio E, Rinaldi L, Marucci G, Musella V, Galati F, Cringoli G, *et al.* Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. Int. J. Parasitol. 2008.39(1):71-79.
195. Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga D.S. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. Infect. Genet. Evol. 2009; 9 (4):606-616.
196. Pozio E. *Trichinella spp.* Imported with live animals and meat. Vet. Parasitol. 2015; 213:46-55.
197. Puljiz I, Beus A, Kuzman I, Seiwerth S. Electrocardiographic changes and myocarditis in trichinellosis: a retrospective study of 154 patients. Ann Trop. Med. Parasitol.2005; 99(4):403-411.

198. Quiroz Rocha G, Bouda J. Obtención y manejo de muestras para análisis en el laboratorio. En Nuñez-Ochoa L, Bouda J, Editores. Patología Clínica Veterinaria 2ª Ed: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México; 2007: p. 14.
199. Quiroz Romero H, editor. Espirurosis. En Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos: Editorial Limusa, México; 2005
200. Ramaswamy K, Hakimi J, Bell R.G. Evidence for an interleukin 4-inducible immunoglobulin E uptake and transport mechanism in the intestine. J. Exp. Med. 1994; 180(5): 1793-1803.
201. Ramírez Valenzuela M, Editor. Epidemiología de la triquinelosis. En: Moreno Chan R. Ciencias veterinaria. Vol. 3. México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. 1981.
202. Ramisz A, Balicka A. Remarks on horse trichinellosis in Poland. Wiad. Parazytol. 1994; 40:381-384.
203. Ravlija J, Puvacić S, Puvacić Z, Curic I. Epidemiological characteristics of trichinosis in federation of Bosnia and Herzegovina. Med. Archiv. 2006; 60(4): 251-254.
204. Reason A.J, Ellis L.A, Appleton A, Wisnewski N, Grieve R.B, McNeil M, Wassom D.L, *et al.* Novel tyvelose-containing tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of intracellular parasite *Trichinella spiralis*. Glycobiology. 1994; 4(5): 593-603.

205. Reveles Hernández R.G, Saldivar E.S, Maldonado Tapia C, Muñoz E.J, Moreno G.M. Evaluación de la infección de *Trichinella spiralis* en cerdos gonadectomizados, Zacatecas, México. Acta Med. Peru. 2011; 28(4):211-216.
206. Ribicich M, Gamble H.R, Rosa A, Bolpe J, Franco A. Trichinellosis in Argentina: An historical review. Vet. Parasitol. 2005; 132(1-2): 137-142.
207. Ribicich M, Gamble H.R, Bolpe J, Sommerfelt I, Cardillo N, Scialfa E, et al. Evaluation of the risk of transmission of *Trichinella* in pork production systems in Argentina. Vet. Parasitol. 2009; 159(3-4): 350-353.
208. Ročkiene A, Ročka V.S. Seroprevalence studies on human trichinellosis in Lithuania. In: Ortega-Pierres G, Gamble H.R, van Knapen F, Wakelin D. Editors. Trichinellosis. Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional México, D.F. México; 1997: P. 503-506.
209. Robinson M.W, McFerran N, Trudgett A, Hoey L, Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to β -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. J. Mol. Graph. Model. 2004; 23:275-284.
210. Rodríguez Osorio M, Gómez García V, Rodríguez Perez J, Gómez-Morales M.A. Seroepidemiological studies on five outbreaks of trichinellosis in southern Spain. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1990; 84(2):181-184.
211. Rodríguez H, Noemí I, Cerva J.L, Espinoza N.O, Castro M.E, Castro M. Paleoparasitological Analysis of skeletal muscle tissue of the Cerro El Plomo mummy from Chile: *Trichinella* spp. Chungara Rev. Antropol. Chile. 2011; 43:581-588.

212. Rojas Retiz J. Evaluación del antígeno de excreción-secreción de larvas infectivas de *T.spiralis* mediante la técnica de Dot-ELISA en comparación con la Inmunoelectrotransferencia (IET) para el serodiagnóstico de la triquinosis porcina. [Tesis]. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México D.F; 1997.
213. Romagnani S. The role of lymphocytes in allergic disease. J. Allergy Clin. Immunol. 2000; 105(3):399-408.
214. Romero Cabello R, Editor. Microbiología y Parasitología Humana, Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias.3ª Ed: Editorial Panamericana. México; 2007: p. 1531-1536.
215. Roy S.L, Lopez A.S, Schantz P.M. Trichinellosis Surveillance United States, 1997-2001. Centers for Disease Control & Prevention (CDC).2003; 52(SS06):1-8.
216. Sadkowska Todys M, Golab E. Trichinellosis in Poland in 2011. Przegląd Epidemiol. 2013; 67(2):259-261.
217. Saenz, S.A, Noti M, Artis D. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. Trends Immunol.2010; 31(11): 407-413.
218. SAGARPA 2007. Informe sobre situación de los Recursos Genéticos Pecuarios de México para la FAO. P.4.
219. SAGARPA 2012. Informe de rendimiento de cuentas de la administración pública federal 2006-2012. P.125.

220. Salazar Gutiérrez G. Detección de larvas de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo, por el método de digestión artificial por medio de ácido clorhídrico, en los municipios de Tequila, Magdalena, Amantitan, Arenal, Ahualulco, Etzatlan y San Marcos Jalisco. [Tesis] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, Jalisco. México; 1985.
221. Salinas Tobón M.R, Martínez Marañón R, Velasco Castrejón O, Chapa Ruiz M.R. Serological analysis of human trichinellosis cases in Mexico during the period of 1984-1990 by standardized ELISA assay. In: Campbell W.C, Pozio E, Bruschi F. (Eds.). Proceedings of the 8th International Conference on Trichinellosis. Instituto Superiore di Sanità Press, Italy. 1994, pp.491-496.
222. Salinas Tobón M.R, Navarrete L.A, Mendez L.B, Esquivel A.D, Martínez A.D, Hernández S.J. *Trichinella spiralis*: strong antibody response to a 49 kDa newborn larva antigen in infected rats. Exp. Parasitol. 2007; 115(2): 160-167.
223. Schenone H¹, Olea A, Schenone H, Contreras M.C, Mercado R, Sandoval L, et al. Current epidemiological Situation of Trichinosis in Chile. 1991-2000. Rev. Med. Chile. 2002; 130(3):281-285.
224. Sequeira G.J, Dalla F.M., Zbrun M.V, Soto L.P, Frizzo L.S, Zarazaga M.P, et al. Estudio epidemiológico de los casos de triquinelosis registrados en la provincia de Santa Fe, Argentina, 1998-2009. Rev. Panam. Salud Pública. 2013; 33(5): 363-369.
225. Sethi B, Butola K.S, Arora B, Kumar Y, Suri V. Human trichinosis in remotes of Uttarakhand, India. Indian J. Med. Sci. 2010; 64(3): 104-110.
226. Sharman S, Anand N, editors. Benzimidazoles. In Pharmacochemostry Library Vol. 25 Approaches to Design and Synthesis of Antiparasitic Drugs. Elsevier Sci. Netherland. 1997: p. 197.

227. Shupe K, Stewart G.L. Stimulated chemotactic response in neutrophils from *Trichinella pseudospiralis*-infected mice and the neutrophilotactic potential of *Trichinella* extracts. *Int. J. Parasitol.* 1991; 21(6): 625-630.
228. Silvestre A, Humbert J.F. Diversity of benzimidazole-resistance alleles in populations of small ruminant parasites. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32:921-928.
229. Skírnisson K, Marucci G, Pozio E. *Trichinella nativa* in Iceland: an example of *Trichinella* dispersion in frigid zone. *J. Helminthol.* 2010; 84(2): 182-185.
230. Skjerve E. Trichinellosis in Norway In: Henriksen S.A, editor. Trichinellosis in the wild fauna. Nordic symposium. Den kgl. Veterinær-og Landbohøjskole i København 26-27 Februar 1992. Copenhagen, Denmark. 1993: p.5-8(In Norwegian).
231. Sofronic Milosavljevic Lj, Pozio E, Patrascu I.V, Skerovic N, Gomez-Morales M.A, Gamble H.R. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. *Parasite.* 2001; 8:S260-S262.
232. Sofronic Milosavljevic Lj, Ilic N, Djordjevic M, Savic M, Gruden Movsesijan A, Cuperlovic K, *et al.* Anti- *Trichinella* antibodies detected in chronically infected horses by IFA and Western blot, but not by ELISA. *Vet. Parasitol.* 2005; 132:107-111.
233. Soulé C, Dupouy C.J, Georges P, Ancelle T, Gillet J.P, Vaissaire J, *et al.* Experimental trichinellosis in horse: biological and parasitological evaluation *Vet. Parasitol.* 1989; 31:19-36.

234. Soulé C, Dupouy C.J, Georges P, Fontaine J.J, Ancelle T, Delvigne A, *et al.* Biological and parasitic variations in horses infested and reinfested by *Trichinella spiralis* Vet. Res. 1993; 24:21-31.
235. Sotiraki S.T, Athanasiou L.V, Himonas C.A, Kontos V.J, Kyriopoulos I. Trichinellosis in Greece a review. Parasite. 2001; 8(2 Suppl):S83-S85.
236. Stojcevic D, Zivicnjak T, Marinculin A, Marucci G, Andelko G, Brstilo M, *et al.* The epidemiological investigation of *Trichinella* infection in brown rats (*Rattus norvegicus*) and domestic pigs in Croatia suggests that rats are not a reservoir at the farm level. J. Parasitol. 2004; 90(3): 666-670.
237. Swarna S.R, Parija S.C. Dot-ELISA for evaluation of hydatid cyst wall, protoscoleces and hydatid cyst fluid antigens in the serodiagnosis of cystic echinococcosis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.2008; 50(4):233-236.
238. Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*.Parasitol Today. 1997; 13(3):104-106.
239. Takahashi Y, Mingyuan L, Waikagul J. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. Vet. Parasitol. 2000; 93(3-4):227-239.
240. Tay Zavala J, Sánchez V.J, Ruiz S.D, Calderón R.L, García Y.Y, Alonso T, *et al.* Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinellosis en la república mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas. Rev. Fac. Med. UNAM. 2004; 47(3):96-100.
241. Tennant B.C, Center S.A. Hepatic Function. In Kaneko J.J, Harvey J.W, Bruss M.L, Editors. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Elsevier Inc., USA. 2008; pp 384.

242. Thornton R, King C. *Trichinella spiralis* disease investigation. *Surveillance*. 2004; 31:5-8.
243. Tinoco Velazquez I, Gomez Priego A, Mendoza R, de la Rosa J. Searching for antibodies against *Trichinella spiralis* in sera of patients with fever of unknown cause. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2002; 96:391-395.
244. Tizard I. Serologic assays. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 1982; 181(10): 1162-1165.
245. Torres Vásquez P, Prada Sanmiguel G.A, Márquez Lara D. Resistencia antihelmíntica en los Nemátodos Gastrointestinales del bovino. *Rev. Med. Vet*. 2007; 13: 59-76.
246. Touratier L. A challenge of veterinary public health in the European Union: human trichinellosis due to horse meat consumption. *Parasite*. 2001; 8(2):S252-S256.
247. Tumino R, Rambau P.F, Callea F, Leoncini L, Monaco R, Kahima J, *et al*. The surgical pathology laboratory in Mwanza, Tanzania: a survey on reproducibility of diagnoses after the first years of autonomous activity. *Infect. Agent Cancer*. 2017; 12(6):1-8.
248. Turk M, Kaptan F, Turker N, Korkmaz M, El S, Ozkaya D, *et al*. Clinical and laboratory aspects of trichinellosis outbreak in Izmir, Turkey. *Parasite*. 2006; 13:65-70.
249. Uribe Gutiérrez G. Análisis de la variabilidad genética en cepas de *Trichinella spiralis* obtenidas de caballos de dos regiones geográficas de México. [Tesis]. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México D.F; 2007.

250. Van De N, Thi Nga V, Dorny P, Vu-Trung N, Ngoc-Minh P, Trung Dung D, *et al.* Trichinellosis in Vietnam. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 2015; 92(6): 1265-1270.
251. Vassilatis D.K, Polvere R.I, Despommier D.D, Goult A.M, Van-der-Ploeg L.H. Developmental expression of a 43 kDa secreted glycoprotein from *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996; 78(1-2): 13-23.
252. Venturiello S.M, Constantino S.N, Giambatolomei G.H. Immune cytotoxic activity of human eosinophils against *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Parasite Immunol.* 1995; 17(11):555-559.
253. Venturiello S.M, Malmassari S.N, Constantino S.N, Nuñez G. Cytotoxicity-blocking antibodies in human chronic trichinellosis. *Parasitol. Res.* 2000; 86(9): 762-767.
254. Viu J. Diagnóstico de alteraciones hepáticas en equinos. *Rev. Complutense Ciencias Vet. Universidad Complutense de Madrid, España.* 2012; 6(2):68-72.
255. Viveros N, Arriaga Díaz C, Banda V, Ortega Pierres G, Yépez L. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite.* 2001; 8:S257-S259.
256. Wang Z.Q, Cui J. The epidemiology of human trichinellosis in China during 1964-1999. *Parasite.* 2001; 8:S63-S66.

257. Wang Li, Yu-Tian X, Sun G.G, Liu R.D, Liu L.N, Zhang X, *et al.* The use of Recombinant 31 kDa Antigens of *Trichinella spiralis* for Serodiagnosis of Experimental trichinellosis. Iranian J. Parasitol. 2015; 10(2):230-237.
258. Webster P, Maddox-Hyttel C, Nöckler K, Malakauskas A, van-der-Giessen J, Pozio E, *et al.* Meat inspection for *Trichinella* in pork, housemeat and game within EU: available technology and its present implementation. Euro. Surveill. 2006; 11:50-55.
259. Wilson N.O, Hall R.L, Montgomery S.P, Jones J.L. Trichinellosis Surveillance United States 2008-2012. Centers for Disease Control & Prevention (CDC). 2015; 64(SS1): 1-7.
260. Wisnewski N, McNeil M, Grieve R.B, Wassom D.L. Characterization of novel fucosyl-and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. Mol. Biochem. Parasitol. 1993.61:25.
261. Wu Z, Sofronic-Milosavljevic Lj, Nagano I, Takahashi Y. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. Parasites & Vectors. 2008; 1(27):1-14.
262. Yépez Mulia L, Ortega Pierres G. Current aspects of trichinosis diagnosis. Rev. Latinoam. Microbiol. 1994; 36(2):127-138.
263. Yépez Mulia L, Arriaga Díaz C, Peña M.A, Gaul F, Ortega Pierres G. Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in Mexico City Zoo. Vet. Parasitol. 1996; 67:237-246.

264. Yépez Mulia L, Arriaga Díaz C, Viveros N, Adame A, Benitez E, Ortega Pierres G. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analysis. *Vet. Parasitol.* 1999; 81:57-68.
265. Yépez Mulia L, Hernández Bello R, Arizmendi Puga N, Fonseca Liñan R, Ortega Pierres G. Contributions to study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Parasite Immunol.* 2007; 29:661-670.
266. Yin H, Price F, Rudnicki M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 2013; 93:23-67.
267. Zheng W, Flavell R.A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4+ T cells. *Cell.* 1997; 89: 587-595.
268. Zheng B.L, Xiao L.H, Wang X.R, Li D.M, Lu Y.X, Zhang Y, *et al.* Study of the 49 kDa excretory-secretory protein gene of *Trichinella native* and *Trichinella spiralis*. *Helminthology.* 2007; 44(3):120-125.
269. Zimmermann W.J. Power and cooking time relationship for devitalization of trichinae in pork roasts cooked in microwave ovens. *J. Food Sci.* 1984; 49(3):824-826.