

199
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA PARA EL DIAGNOSTICO DE TRIQUI- NELOSIS.

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P O R

MARIA GUADALUPE ROBLEDO PEREZ



Asesores: MVZ Greta Ruiz L.
MVZ Emeterio Saldívar Z.



México, D. F.

1989.



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 está 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.

CONTENIDO

	<u>Páginas</u>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2 - 4
MATERIAL	5
METODO	6 - 8
INTERPRETACION	9 - 10
RESULTADOS	11 - 14
DISCUSION	15 - 16
CONCLUSIONES	17
LITERATURA CITADA	18 - 21

RESUMEN

Robledo Pérez María Guadalupe. Implementación de la técnica de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de triquinosis.

Asesores: M.V.Z. Greta Ruiz L. y H.V.Z. Emeterio Saldivar Z.

La triquinosis es una enfermedad endémica en México causada por Trichinella spiralis. Los métodos utilizados para el diagnóstico de esta zoonosis son variados y algunos de ellos inespecíficos. La implementación de la técnica de inmunoensayo en capa delgada se realizó por las características que esta presenta como son: específica, bajo costo, sencilla y de fácil capacitación del personal. Para llevar a cabo la técnica, se preparó un antígeno somático - del parásito que fue obtenido por el método de digestión artificial de ratas infectadas experimentalmente; se obtuvo un antisuero anti-T. spiralis que fue preparado en conejos clínicamente sanos, utilizando sueros negativos de rata y de conejos.

Posteriormente se procedió a infectar 20 ratas con el parásito y 5 se manejaron limpias para realizar 3 sangrados, la técnica primeramente se manejó con los sueros sin diluir y después se realizaron diluciones dobles seriadas.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica es específica y puede servir para el diagnóstico de triquinosis.

IMPLEMENTACION DE LA TECNICA DE INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA (ICD) PARA EL DIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS

INTRODUCCION

La triquinelosis es una zoonosis parasitaria presente en casi toda América. En nuestro país representa un problema de salud pública considerable; por las costumbres en la preparación de alimentos cárnicos, favorecen su persistencia y que el número de casos reportados sea cada vez más alto (1, 11, 19, 21, 22, 38).

El agente etiológico del padecimiento es un nemátodo Trichinella spiralis (T. spiralis), tiene un curso agudo caracterizándose por fiebre, trastornos gastrointestinales, dolores musculares y eosinofilia, con mortalidad elevada dependiendo del número de larvas que invadan al organismo (19, 20, 31).

En México se han desarrollado estudios sobre diagnóstico de triquinosos tanto en humanos como en cerdos, y la mayoría de estos se refieren a la prevalencia de la enfermedad (5, 7, 22). En la actualidad se empiezan a realizar estudios epidemiológicos, estos nos indican que la triquinosos humana se llega a presentar con frecuencia, pero la dificultad que tiene su diagnóstico no permite que en la mayoría de las ocasiones se detecte el problema.

Las pérdidas económicas que ocasiona y el riesgo de salud pública que representa enfatizan la necesidad de un diagnóstico adecuado (1, 5, 11, 21, 22, 23, 33).

Varios son los métodos que han empleado para el diagnóstico de la triquinosos en México, a continuación se mencionan los más importantes.

En algunos rastros en México, hasta hace algunos años, se utilizó un método microscópico que consistía en observar a través de un triquinoscopio, la presencia de las larvas en cortes finos de carne. Esta técnica ha caído en desuso por su poca seguridad.

El método de digestión artificial, actualmente poco usado como prueba de diagnóstico, es una prueba macroscópica que tiene el inconveniente de requerir muchas horas de trabajo así como de cierta cantidad de carne; esta técnica consiste en observar las larvas libres como resultado de la digestión de carne (32, 33, 36, 39).

Para el diagnóstico serológico se han utilizado pruebas de laboratorio tales como: Reacción cutánea de Backman y la prueba de Aglutinación con Bentonita (también llamada de floculación). La prueba cutánea aparece positiva entre la cuarta y sexta semana después de la infección en sólo el 60-70 % de los sujetos (12,15, 32). La aglutinación con bentonita se puede observar positiva alrededor de los 30 días post-infección en un 95 % de los sujetos. El mayor inconveniente de estas pruebas es que el diagnóstico positivo se determina demasiado tarde después de la infección (en promedio cuatro semanas) (20,32).

También se señala la prueba llamada uroprecipitación que en la actualidad ya no es de uso común y que consiste en detectar la presencia del antígeno concentrado en la orina del paciente. Esta ha demostrado muy poca sensibilidad y especificidad para su uso en la práctica rutinaria (20, 32).

De las técnicas de aglutinación la más usada es la de hemoaglutinación pasiva que detecta cantidades muy pequeñas de anticuerpos en suero, exponiéndolo a una cantidad constante de una suspensión estandarizada de eritrocitos tanizados o latex sensibilizados con el antígeno específico. Una de las desventajas de esta prueba es que solamente el 1 % del antígeno, usado para sensibilizar a los glóbulos rojos, se adhiere a los eritrocitos con posibilidad que la sensibilidad se pierda (12, 20, 24).

Existen otras dos técnicas de diagnóstico: la prueba de precipitación cuya sensibilidad es baja y la técnica de fijación de complemento que llega a detectar anticuerpos a los 7-10 días post-infección. El inconveniente de esta última es que implica una preparación meticulosa de los reactivos para que estén debidamente estandarizados; la prueba de fijación de complemento se usa exclusivamente para el diagnóstico de infecciones humanas (20).

La prueba de contrainmunolectroforesis es una técnica que combina las características de separación electroforética de las partículas protéicas y su difusión en gel aprovechando un efecto electroendosmótico causado por corrientes eléctricas al pasar a través de un amortiguador con pH de 8 y una molaridad determinada. Esta prueba ha sido evaluada utilizando suero de humano con actividad serológica hacia *T. spiralis* y cuando se comparó con la prueba de precipitación de Ouchterloney demostró ser más rápida y específica pero su utilización en el campo es imposible por el equipo que se requiere para llevarla a cabo (2, 4, 7, 20, 41).

La prueba de inmunofluorescencia y ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) han demostrado ser más sensibles y específicas. Aunque los resultados experimentales son satisfactorios no es factible realizarlas a nivel de campo por la sofisticación del material y equipo (15, 18, 20).

En algunas de estas pruebas se han usado animales infectados experimentalmente mientras que en otras se han manejado animales infectados en forma natural. Por lo cual los resultados obtenidos han sido diferentes, lo que ha dificultado concluir cuál es la prueba más adecuada para el diagnóstico de triquinosis en condiciones de campo (15, 24, 25, 26).

La técnica de inmunoensayo en capa delgada (I C D), ha sido empleada para el diagnóstico de enfermedades virales y parasitarias como: esquistosomiasis, oncocercosis, fascioliasis, hidatidosis, amibiasis, enfermedad chagas y triquinosis. Esta técnica fue descrita por primera vez en 1977 por Elwing y col., y se basa en las propiedades que presentan muchos antígenos de poder adsorberse sobre las superficies hidrofóbicas de poliestireno. Al aplicar un suero positivo sobre las cajas de petri sensibilizadas con el antígeno se llevará a cabo la reacción antígeno-anticuerpo que se visualiza por medio de diferentes patrones de condensación cuando la caja se expone a vapores de agua (8, 9, 10, 17, 29, 30).

Esta prueba de diagnóstico tiene ciertas ventajas como son: bajo costo, fácil de implementarse, sencilla capacitación del personal y susceptible de ser usada con relativa facilidad en condiciones de campo. Otro de los atractivos es que tiene una aceptable sensibilidad por lo que puede ser útil en muestreos masivos para realizar estudios epidemiológicos, así como la evaluación en el control de esta enfermedad (9, 10, 20, 25, 26).

HIPOTESIS

La prueba de Inmunoensayo en capa delgada se puede utilizar para el diagnóstico de triquinosis.

OBJETIVO.

Montar la técnica de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de triquinosis.

MATERIAL

Material Biológico

1. Antígeno: I. spiralis donada por el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

2. Preparación del antígeno. Se utilizaron 20 ratas con un peso promedio de 400 gramos, sexadas y separadas en 4 lotes de 5 animales cada uno. Estos animales se infectaron por vía oral con 1500 larvas de I. spiralis.

3. Obtención del antisuero: Se utilizaron cuatro conejos adultos de dos meses de edad, dos de ellos para preparar el antisuero y los otros dos como controles negativos.

4. Como controles positivos se utilizó el suero de 20 ratas infectadas por vía oral con 1500 larvas de I. spiralis. Como controles negativos se usó el suero de 5 ratas sin infectar.

Soluciones

1. Preparación de jugo gástrico artificial:
 Pepsina 7 g.
 NaCl 2.5 g.
 Acido Clorhídrico 10 ml.
 Cuanto baste para 1000 ml. de agua destilada.
2. Solución de fosfatos salina (P B S). Este buffer se prepara a partir de dos soluciones:

Solución " A "

NaCl 8.0 g.

KCl 0.2 g.

Estas dos sales se mezclan con 800 ml. de agua destilada.

Solución " B "

Na₂HPO₄ anhidro 1.15 g. ó 7H₂O 2.172 g.

KH₂PO₄ 0.2 g.

Estas dos sales se mezclan en 800 ml. de agua destilada.

Esterilizar ambas soluciones por separado a 15 libras durante 15 minutos. Posteriormente mezclar lentamente la solución "A" en la " B " y medir el pH que deberá ser de 7.2.

- 3 -Solución Salina Fisiológica (S S F).
 NaCl 0.85 g.
 Cuanto baste para 1000 ml. de agua destilada.
 Se mezcla perfectamente bien con el agua.

METODO

Las larvas de *J. spiralis* se obtuvieron de ratas infectadas por el método de digestión artificial (23, 32, 35, 36).

1. Obtención del antígeno soluble.

a) Se lavaron las larvas en SSF repitiendo el proceso hasta que el sobrenadante se observó claro.

b) Posteriormente se congelaron a - 70 C en solución salina buferada con un pH 7.2.

c) A las 48 horas se descongelaron y fueron sonicadas durante 12 minutos a 5 wats en un sonicador "Branson Sonic-Danbury Connecticut" para obtener el antígeno soluble (27, 28).

d) Posteriormente se le determinó la cantidad de proteína por el método de Biuret (13).

e) El antígeno soluble se envasó en alícuotas y se congeló a - 70 C hasta su empleo.

2. Obtención del antisuero anti-*J. spiralis*.

a) Para obtener el antisuero se inmunizaron dos de los cuatro conejos con el siguiente calendario de inoculaciones (25, 26):

Inoculación	Tiempo	Dosis	Via de Inoculación
1	Día 0	5 mg.de Ag.	Subcutánea
2	Día 15	5 mg. de Ag.	Subcutánea
3	Día 30	0.250 mg. de Ag.	Intramuscular
4	Día 31	0.500 mg. de Ag.	Intramuscular
5	Día 32	1 mg. de Ag.	Intramuscular

En la primera y segunda inoculaciones el antígeno soluble se mezcló con el adyuvante completo de Freund (LABORATORIOS DIFCO).

El sangrado se llevó a cabo el día 79, una semana después de aplicar la última dosis, separando el suero y congelándolo a -70 C hasta que fue usado.

3. Obtención del suero de las ratas infectadas artificialmente.

a) Se utilizaron 25 ratas hembras distribuidas en cuatro lotes de cinco ratas cada uno.

b) Las ratas de cuatro lotes fueron infectadas por vía oral con 1500 larvas de *T. spiralis* obtenidas por el método de digestión artificial (23, 24, 32, 36).

c) El quinto lote fue el control negativo. El manejo de estas ratas fue el mismo que el de las ratas infectadas.

d) El día que las ratas se infectaron se consideró como día cero. A partir de este día se sangró a cada animal por corte de cola, los días 7, 14 y 21, posteriormente se obtuvo el suero y congeló a -70 C.

4. Procedimiento para montar la técnica de ICD.

a) Se utilizaron cajas de petri de plástico nuevas, que se lavaron con etanol al 70 %.

b) Las cajas fueron secadas perfectamente bien con un ventilador.

c) Posteriormente se sensibilizaron con el antígeno soluble de *T. spiralis* a una concentración de 2.7 µg. de proteína por mililitro (8, 9, 10, 25, 25, 26, 29, 30).

d) Se incubaron las cajas en cámara húmeda a 37 C durante 30 minutos.

e) A continuación se eliminó el exceso de antígeno lavando las cajas tres veces con agua destilada y se secaron siguiendo el método descrito en el punto "b". Estas cajas sensibilizadas fueron cerradas herméticamente y almacenadas en el refrigerador a 4 C durante 24 horas para utilizarlas después.

f) Posteriormente se realizaron diez diluciones dobles seriadas de cada suero de las 25 ratas infectadas iniciando con una dilución 1:4. Sobre la superficie de la caja sensibilizada, se colocaron 25 μ l de cada dilución siguiendo el patrón de la figura 1. Este patrón de referencia se dibujó, para cada caja en papel milimétrico señalando las posiciones de los sueros y sus diluciones. La prueba se corrió dos veces con cada uno de los sueros de estas ratas así como con los controles negativos y positivos.

g) Después de haber depositado los sueros en las cajas sensibilizadas estos se incubaron durante 60 minutos en cámara húmeda a 37 C .

h) Pasados los 60 minutos de incubación se llenó la tapa de las cajas de Petri sensibilizadas con agua destilada a 60 C invirtiendo la caja sensibilizada sobre esta tapa durante 60 segundos. A continuación la caja sensibilizada se lavó tres veces con agua destilada.

i) Nuevamente fueron secadas siguiendo el método descrito en el punto "b".

j) Finalmente se repitió el paso " h " manteniendose las cajas sobre las tapas de 45 a 120 segundos.

5. Para probar los sueros controles positivos y negativos se utilizo la prueba de precipitación en gel; esta permite evaluar cualitativamente la pureza tanto del antígeno como del antisuero(16, 34, 37).

INTERPRETACION

Si el antígeno soluble de triquina se fija a la superficie de plástico, en los sitios donde se coloque un suero con anticuerpo específico, se observará una mayor condensación de agua en comparación con la producida con un suero negativo y el resto de la caja.

La condensación del vapor de agua en la reacción antígeno-anticuerpo se debe a la formación de complejos proteicos hidrofílicos de un tamaño mayor a los observados en el resto de la caja (8, 9, 10, 17).

La lectura se realizó siguiendo los siguientes patrones (Figura 2).

Gotas grandes que llenan la superficie donde se aplicó el suero ----- (+)

Patrón de condensación igual al observado en el resto de la caja ----- (-)

Con los sueros de las ratas infectadas artificialmente la superficie de condensación será inversamente proporcional a la dilución del suero.

Figura 1.- Patron de referencia para la distribución de los sueros en las cajas de petri para la prueba de I.C.D.

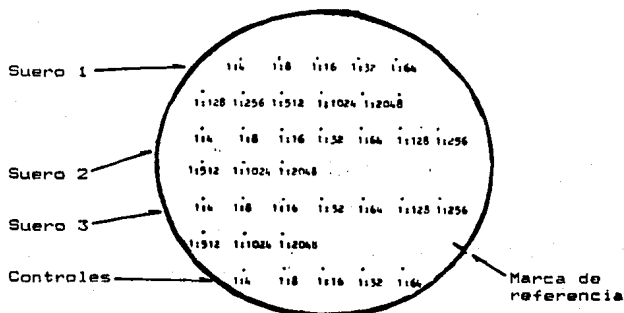
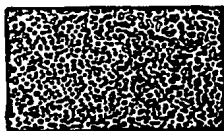


Figura 2.-Patrones de condensación del agua en una reacción positiva y una negativa.



REACCION POSITIVA



REACCION NEGATIVA

RESULTADOS

Para la obtención del antígeno soluble se siguieron los mismos procedimientos marcados en el método, el número de veces que se descongelaron las larvas fue de tres, obteniéndose buenos resultados.

La cantidad de proteína que se logró obtener durante la primera preparación fue de 2.5 mg de proteína en 10 ml y en la segunda preparación fue de 7.5 mg por ml en un volumen total de 15 ml. El primer antígeno se utilizó para implementar la técnica y el segundo para titulación de los sueros.

Durante el tercer sangrado de las ratas infectadas, solo se obtuvo suero de 21 ratas, las otras 4 murieron. En las 4 ratas muertas y 12 más que se sacrificaron se comprobó su parasitosis por el método de triquinoscopia con músculo diafragmático e intercostales.

En la prueba de precipitación en gel que se realizó para probar el antígeno soluble y los sueros controles, se observó en el positivo una sola línea de precipitación y en el negativo no se observó.

Durante la realización de todas las pruebas se manejaron sueros controles tanto negativos como positivos.

Los sueros de los tres sangrados fueron manejados sin diluir para probar la técnica, obteniéndose los siguientes resultados.

CUADRO # 1

RESULTADO DE LOS SUEROS TRABAJADOS SIN DILUIR OBTENIDOS DE
25 RATAS INOCULADAS CON *T. spiralis*.

=====					
SANGRADO	TOTAL DE	ANIMALES	ANIMALES	ANIMALES	ANIMALES
	ANIMALES	ANIMALES	POSITIVOS	ANIMALES	NEGATIVOS
	SANGRADO	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%
1	25	0	0	25	100
2	25	1	4	24	96
3	25	13	52	12	48

Obtenidos los resultados anteriores se procedio a titular los sueros de los tres sangrados con diez diluciones dobles seriadas, empezando con una dilución 1:4.

CUADRO # 2

RESULTADOS DE LOS TRES SANGRADOS CON DOS REPETICIONES CADA UNA (A y B), MARCANDO LAS DILUCIONES A LAS QUE RESPONDIERON Y LOS NEGATIVOS.

SANGRADOS	1		2		3	
REPETICIONES	A	B	A	B	A	B
1	-	-	-	-	1:16	1:16
2	-	1:4	-	-	1:8	1:16
3	1:8	1:8	-	1:4	1:16	1:16
4	-	1:4	-	1:4	1:16	1:16
5	-	-	-	-	1:8	1:16
6	-	-	-	-	1:16	1:8
7	-	-	-	-	1:8	1:16
8	-	-	-	-	1:16	1:16
9	-	1:4	1:4	1:4	1:16	1:16
10	-	-	-	-	1:4	1:8
11	-	-	1:4	-	1:16	1:16
12	-	-	-	-	1:8	1:8
13	-	-	1:4	-	1:16	1:16
14	-	-	-	-	1:32	1:16
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	1:32
17	-	-	-	-	1:32	1:8
18	-	-	-	-	1:8	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	1:16	1:16
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-
26 *	-	-	-	-	-	-
27 **	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256	1:256

* Control negativo

** Control positivo

Posteriormente considerando que en el tercer sangrado habia una respuesta mas alta ,con respecto a los dos anteriores ,se procedió a titular nuevamente los sueros de este sangrado. Para evitar lecturas orientadas con los resultados anteriores se modificaron las identificaciones de cada uno de los sueros.

CUADRO # 3

RESULTADO DE LOS SUEROS DILUIDOS DEL TERCER
SANGRADO DE 25 RATAS INOCULADAS CON T. spiralis.
(Primera repetición)

No. de los sueros	DILUCIONES										
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
12	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26 *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27 **	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	

* Controles negativos

** Controles positivos

CUADRO # 4

RESULTADO DE LOS SUEROS DILUIDOS DEL TERCER
SANGRADO DE 25 RATAS INOCULADAS CON T. spiralis.
(Segunda repetición).

No. de los sueros	DILUCIONES									
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 **	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

* Controles negativos

** Controles positivos

DISCUSION

De acuerdo a trabajos citados sobre la técnica de ICD se reportan resultados satisfactorios tanto en la sensibilidad como en la especificidad, solo para Tripanosomiasis Americana mostró una baja sensibilidad, de acuerdo a esto se considero implementar la técnica para el diagnóstico de triquinelosis y determinar si se puede adaptar a condiciones de campo (29, 30).

En la preparación del antígeno se marcaba una filtración que al llevarla a cabo eliminaba toda la proteína detectable por el método de Biuret, considerando estos resultados el antígeno que se utilizo en la técnica no se filtro. La diferencia entre la cantidad de proteína de antes y después del filtrado era considerable ya que en algunos casos no se llegaba a detectar nada y después del cambio se determino hasta 12.7 mg de proteína en 5ml. Por cada caja se usaron 2.7 mg de proteína diluidos en 10 ml. de PBS para cubrir perfectamente la superficie de la caja.

Las cajas que se usaron de inmediato, después de la sensibilización trabajaron exactamente igual que las que se usaron 24 horas, 15 y 30 días después de sensibilizadas, y no se observo ninguna alteración tanto para fijarse la reacción así como para realizar la lectura.

La temperatura, tiempo de incubación y concentración óptima de antígeno se mantuvo como lo mencionan los diferentes autores. (8, 9, 10, 17, 29, 30).

La utilización de animales de laboratorio (ratas y conejos) en el presente trabajo obedeció a su fácil manejo y posibilidad de controlar diferentes parámetros como dosis infectante, alimentación y tiempo de infección.

Cuando se evalúa una respuesta inmune humoral normal se conoce de antemano que la producción de anticuerpos detectables alcanza su pico máximo alrededor de la segunda semana después de la inoculación es por esto que se decidió realizar solo tres sangrados con espacio de siete días cada uno, a partir de la inoculación del antígeno (2, 16, 34, 37).

Para realizar la técnica de ICD se utilizó el antígeno soluble de *T. spiralis* y se detectaron anticuerpos específicos contra este nemátodo, el comportamiento en las ratas no fue el mismo, ya que en este intervienen diversos factores propios del huésped. Se observó en forma general un incremento del título de anticuerpos a partir de la tercera semana de infección.

Los animales sufrieron un problema respiratorio entre el primero y segundo sangrado, para lo cual tuvieron que ser tratadas con 0.5 ml. de ampicilina por vía oral por rata durante tres días (Omnipen, suspensión Lab. Wyeth-Wales, S.A.).

En la prueba de precipitación en gel, la formación de una línea de precipitado entre un antígeno y su correspondiente anticuerpo, se utilizó como una evaluación cualitativa de la pureza del antígeno. Sin embargo la baja sensibilidad de la prueba restringe sus aplicaciones, pero para probar una reacción antígeno-anticuerpo esta prueba es la más indicada (16, 34, 37).

Para comprobar la infección de las ratas, una vez sangradas, se utilizó la técnica de triquinoscopia confirmando su parasitosis. Las muestras de músculo para la técnica de triquinoscopia se tomaron siguiendo lo mencionado por Dick y Stewart.

El título que se consideró como positivo fue de 1:16 o mayor a este de acuerdo al patrón descrito por Peña 1987.

Los resultados que se observan en el cuadro número 1 y 2 muestran una respuesta al antígeno, donde los títulos más altos se encuentran en el tercer sangrado; por lo que se piensa que los del primero y segundo sangrado no son específicos de I. spiralis, ya que es posible que puedan cruzar con algún otro microorganismo (40).

Con respecto a la realización de la primera y segunda repetición de la prueba de I C D para los sueros del tercer sangrado (cuadros 3 y 4), se consideró que si había alguna duda se aclararía en una repetición más, los resultados que se obtuvieron fueron favorables ya que los títulos que se observan no fueron tan variables como los sueros de los sangrados anteriores, considerando que la identificación de cada uno de ellos se modificó para no inclinarse hacia algún título en especial. La diferencia que hay entre una dilución y la otra se puede deber a que los sueros se descongelaron varias veces y no se almacenaron las dosis requeridas para cada prueba.

De los resultados de este trabajo se desprende que la prueba de ICD detecta adecuadamente anticuerpos anti-I. spiralis en sueros de rata y conejos, utilizando un antígeno soluble de I. spiralis, lo cual da lugar a continuar la evaluación de esta técnica para poder ser utilizada en el diagnóstico de triquinosis.

CONCLUSIONES

1.-La prueba de I C D detecta anticuerpos específicos contra T. spiralis a la tercera semana después de la infección.

2.-Los valores del título de anticuerpos de la prueba de I C D para triquinosis se consideran como positivos a partir de 1:16 o mayores a éste.

3.-La prueba de I C D funciona para determinar anticuerpos anti-T. spiralis en ratas.

4.-Por los resultados obtenidos, se sugiere seguir realizando estudios sobre la evaluación de la prueba de I C D en sueros de cerdo infectados tanto natural como experimentalmente.

LITERATURA CITADA

- 1.- Acha, P. N. y Szyfres, B. : Zoonosis y Enfermedades transmisibles Comunes al Hombre y los Animales Organización Panamericana de la Salud, Publicaciones Científicas No. 354, O.M.S. Washington D. C., E.U.A. 1977.
- 2.- Arriaga, D. C. : Evaluación de tres diferentes antígenos de *T. spiralis* en la prueba de ELISA para el diagnóstico de la triquinosis en cerdos de traspatio. Memorias de la Reunion Pecuaria México. México, D.F., 1987.
- 3.- Barriga, O.O. : Inmunología de la Infección por *Trichinella spiralis*. Memorias del Curso de Actualización de Zoonosis Parasitarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D.F., 1982.
- 4.- Davis, D.B. : Tratado de Microbiología. Segunda edición, Editorial Salvat, España, 1978.
- 5.- Del Rio, C. A. y Herrera D. M. R. : Primer hallazgo de *Trichinella spiralis* en el diafragma de un cadáver en Zacatecas. Nota previa., Salud Pub. Mex., (6):596-598 1984.
- 6.- Dick, A.T. and Silver, B. B. : Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. J. Parasitol., 66 (3), 472-477 (1980).
- 7.- Despommier, D., Muller, M. and Jenks, B. : Immunodiagnosis of Human Trichinosis using Counter Electrophoresis and Agar Gel Diffusion Techniques. Am. Jour. Trop. Med. Hyg., 23 (1): 41-44, (1974).
- 8.- Elwing, H., : Visualitation principles in thin-layer immunoassays (TIA) on plastic surface. Int. Arch. Allerg. and Appl. Immun., 51: 757-762, (1976).
- 9.- Elwing, H., Nilsson, L. and Ouchterlony, O. : A Simple Spot Technique or Thin Layer Immunoassay (TIA) on Plastic Surface. J. Immun. Meths., 17: 131-145, (1977).
- 10.- Elwing, H. and Ouchterlony, O. : Application of Thin Layer Immunoassays (TIA) as a Serodignostic tool in Shistosomiasis. A Preliminary Report. Trans. Roy. Med., 74 (2): 201-204, (1980).

- 11.- Fragozo, U., Tavizón, G. y Campos, R. : Informe de un Brote de Triquinosis en Laguna de Carretero Zacatecas. Infectología., Año V , (6): 169-1973, (1985).
- 12.- Garay, G.E. : Especificidad y Sensibilidad de Diferentes Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de Fasciolosis en Ovinos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1983 .
- 13.- Garvey, S.J. and Cremer, E. N.: Methods in Immunology: A laboratory text for instruction and research advances book program. Third edition, W. A. Benjamin INC., EUA, 1977.
- 14.- Gomez, A., A. : Estudio comparativo de dos antígenos somáticos de Fasciola hepatica en el diagnóstico de fasciolosis en ovinos. Vet. Mex., 15 (3):193-198, (1984).
- 15.- Heyneman, D. : Inmunidad Parasitaria: Nemátodos. En: Fundenber, H.H., Stites, D.P., Caldwell, J.L. y Wells, J.V. : Inmunología Clínica , Quinta Edición , El Manual Moderno , 701-716, 1985.
- 16.- Hudson, L., and Hay, F. : Practical Immunology Second Edition, Blackwell Scientific Publication, London, 1980.
- 17.- Jeanson, S. : Thin- layer immunoassay for detection of antibody to herpes simplex virus. J.Clin.Microb. 9:317-322, (1979).
- 18.- Knapen, T. and Franchimont, J.H.: Husbrandy, Parasitic and other diseases as factors in the releability on the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for Detection of Trichinellosis in Pig. Vet. Paras. , 16: 17-22, (1984).
- 19.- Lapage, G.: Parasitología Veterinaria. Sexta edición, CECSA, México, pp. 173-177, 1981.
- 20.- Larsh, J.E.: Immunology. In: Gould, M.D.: Trichinelosis in man and animals, S. E. Charles C. F. Thomas, Springfield Illinois, USA., pp. 129-145, 1970.
- 21.- Martínez, M. R.: A small familial outbreak of trichinelosis in Naucalpan México. Salud Pub. Mex., 21: 161-165, (1979).
- 22.- Martínez, M. R.: Is trichinelosis increasing in México? Could this be a unexpected consequence of our "Development"? Salud Pub. Mex., 27 (1): 40-51, (1985).

23.- Mazzotti, L. y Pastrana, A.: La investigación de triquinosis en tejido muscular por el método de digestión. Rev. Inst. Salud y Enf. Trop., 4 (4): 337-342, (1943).

24.- Medina, G. L. R.: Reactividad de suero de cerdo ante un antígeno de Trichinella spiralis. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional de México, D. F., 1977.

25.- Morilla, G. A.: Inmunoensayo en capa delgada. Manual de laboratorio del curso de actualización de Inmunología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México, D.F., pp. 40-43, 1979.

26.- Morilla, G. A.: Evaluación preliminar de la prueba de Inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de la fasciolosis en animales. Vet. Mex., 10 (3): 181-186, (1979).

27.- Murrell, K.D.: Immunization of swine against Trichinella spiralis. Vet. Parasitic.; 15: 263-270, (1984).

28.- Perrudent-Badoux, A. and Binaghi, R.: Isolation and properties of a soluble antigen of Trichinella spiralis. Immunol., 26: 1217-1223, (1974).

29.- Peña, P., A.: Evaluación de la prueba de Inmunoensayo en capa delgada (I C D) para la detección de anticuerpos anti-T. spiralis en animales infectados experimentalmente. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 1987.

30.- Peña, P., A.: Evaluación de la técnica de inmunoensayo en capa delgada en la triquinosis experimental en roedores. Memorias de la Reunion Pecuaria México. México D. F., 1987.

31.- Quiroz, R. H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Limusa, México, pp. 574-581, 1984.

32.- Saldivar, M. C. J.: Diagnóstico de Trichinella spiralis por los métodos de digestión artificial y triquinoscopia. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., 1979.

33.- Suárez, M. G. : Algunas consideraciones sobre Triquinosis . Tesis de Licenciatura. Escuela de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.1945.

34.- Stites, P. D.: Inmunología Básica y clínica, Quinta Edición, El Manual Moderno, 1985.

35.- Stewart, L.G., and Charniga, M.,L.: Distribution of Trichinella spiralis in muscle of the mouse. J. Parasitol.,66(4), 688-689 (1980).

36.- Tarazona, V., J., M.: Manual de técnicas de parasitología veterinaria. Acribia ,España, pp. 83-84, 1971.

37.- Tizard, I.: Inmunología Veterinaria. Segunda edición, Interamericana, México, 1984.

38.- Vargas, G. R.: Epidemiología de las zoonosis transmitidas por la carne. Memorias del curso de actualización de Zoonosis Parasitarias. Fac. de Med. Vet. y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., 1982.

39.- Vega, A. N.: Triquinelosis en Medicina Veterinaria. Memorias del Curso de Actualización de Zoonosis Parasitarias. Fac. de Med. Vet. y Zoot. , U N A M , México , D. F.1982.

40.- Weiner, L., M., and Leely, J.,: The nature of the antigenic relationship T. spiralis and Salmonella Typhi. J. Immun. ,92:908-911, (1964).

41.- Woodenhouse, R. P.: Antigenic analysis and standardization of trichina extract B and gel diffusion. Annals of Allergy, 14: 121-138, (1956).