



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS " IZTACALA "

**DETECCION POR ELISA
E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA
DE ANTICUERPOS CONTRA *Trichinella Spiralis*
EN SUEROS DE CABALLOS INFECTADOS
NATURAL Y EXPERIMENTALMENTE
CON EL PARASITO**

B01202/96
Ej. 1

T E S I S

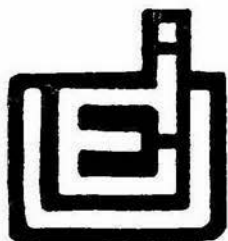
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

PRESENTA:

NOEMI VIVEROS GUZMAN

ASESORES:

**DRA. LILIAN YEPEZ MULIA
DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES
DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ**



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

MARZO 1996



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.

ESTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO:

EN EL LABORATORIO DE PARASITOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CMN SIGLO XXI, IMSS Y EN EL LABORATORIO 2 DEL DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N., BAJO LA DIRECCION DE LA DRA. LILIAN YEPEZ MULIA Y DE LA DRA. GUADALUPE ORTEGA PIERRES. EN COLABORACION CON LA DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ INVESTIGADOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIAS EN MICROBIOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES Y AGROPECUARIAS, SARH.

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

DEDICATORIAS

A mis padres:

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

A mi familia:

A mis hermanos Olga y Darío, así como a mi cuñado Emilio y a mi sobrina Teresa Sarahí por la ayuda, cariño y apoyo que siempre me han brindado y la confianza que tienen en mí y que nunca defraudaré.

A la familia Reyes Santos:

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

A mis tíos y primos:

Manuel, Gelacia, Felipa, Magdalena, Guadalupe, Ninfa, Isela, César y José por todos los buenos y placenteros momentos que siempre convivimos. Y a mi abuelitos Isidora y José por todas las maravillosas cosas que siempre me dieron.

A Raúl:

Te dedico esta tesis con todo mi amor, cariño y amistad. Te agradezco toda la comprensión, paciencia y bellos momentos a tu lado. Gracias por todo lo que compartimos día a día. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lilián Yépez Mulia.

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

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres

Por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de trabajo en el Lab. 2 del Depto. de Genética y Biología Molecular. Por todo su apoyo y observaciones recibidas.

A la Dra. Camila Arriaga Díaz

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

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera

Por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis. Además de permitirme la estancia en su laboratorio.

A mis amigos

Araceli, Claudia, Cruz, Hugo, Jesús, Miguel, Patricia, Rocío, Verónica y Vicente. Por todos los momentos tan felices que compartimos y sobre todo por brindarme su valiosa amistad.

A mis compañeros de laboratorio

Amparo, Arturo, Blanca, Beatriz, Fátima, Fernando, Guadalupe, Ma. Elena, Maricela, Marco, Nancy, Oscar, Raúl, René, Rocío y Rosario y a las farsantes de Biología Molecular (Amanda, Gloria, Hilda, Maribel, Mónica, Norma y Patricia) que me han facilitado el camino para llegar aquí.

A todo el personal de la UIMEIP y del CINVESTAV que cooperó para la realización de este trabajo, en especial al Sr. Garzón y al Sr. Luna personal del Departamento de Fotografía.

INDICE

ABREVIATURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
INDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
I INTRODUCCION	1
II ANTECEDENTES	7
III JUSTIFICACION	10
IV OBJETIVOS	11
V MATERIAL Y METODOS	12
1.- Mantenimiento del ciclo de vida y obtención de larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i>	12
2.- Obtención del extracto total de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	12
3.- Purificación de los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	13
4.- Cuantificación de las proteínas los extractos totales y purificados de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	14
5.- Infección experimental de los caballos	14
6.- Muestras de suero y de diafragma de animales de rastro	15
7.- Digestión artificial	15
8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones reductoras	15
9.- Inmuno-electrotransferencia (IET)	16
10.- ELISA	17
11.- Caracterización morfológica e identificación de especie de <i>Trichinella</i>	18
VI RESULTADOS	19
VII DISCUSION	33
VIII CONCLUSIONES	37
IX APENDICES	38
X REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41

ABREVIATURAS

ASB	Albúmina Sérica Bovina
Bisacrilamida	N´N´-metilen-bis-acrilamida
DNA	Acido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en placa sólida
E/S	Excreción/Secreción
g	gravedades
hr	hora
IET	Inmunolectrotransferencia
kDa	kilodaltons
M	Molar
min	minuto
mM	milimolar
nm	nanómetros
µg	microgramos
µl	microlitros
PBS	amortiguador de fosfatos salino
p.i.	post-infección
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluorido
STD	Suero de Ternera Descomplementado
S/E	Superficie/Esticosoma
T. A.	Temperatura Ambiente
Temed	N´N´N´-Tetrametiletilediamina
TLCK	N-p-Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona
TPCK	L-1-Tosil-2-Fenil-Etilclorometil Cetona
Tween 20	Polioxietilenesorbitan monolaurato

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Frecuencia de signos clínicos presentados en los tres brotes de triquinelosis humana ocurridos en Francia e Italia ocasionados por el consumo de carne de caballo.	3
Tabla 2.	Brotos de triquinelosis humana ocurridos en Italia y Francia de 1975 a 1993, ocasionados por el consumo de carne de caballo.	8
Tabla 3.	Número de larvas/gramo detectadas en diferentes músculos de los caballos infectados experimentalmente con <i>Trichinella spiralis</i> determinado por digestión artificial.	28
Tabla 4.	Número de larvas/gramo detectadas en el diafragma de caballos de rastro determinado por digestión artificial.	29

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> .	2
Fig. 2	Antígenos de superficie/esticosoma (S/E) purificados mediante una columna de afinidad usando el anticuerpo monoclonal NIM-M1.	5
Fig. 3	Análisis electroforético del extracto total de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	20
Fig. 4	Cinética de detección de anticuerpos determinados por ELISA dirigidos contra <i>Trichinella spiralis</i> en sueros del caballo (No. 1) infectado experimentalmente con el parásito.	21
Fig. 5	Cinética de detección de anticuerpos determinados por ELISA dirigidos contra <i>Trichinella spiralis</i> en sueros de caballos infectados experimentalmente con el parásito.	22
Fig. 6	Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunolectrotransferencia de los componentes de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> por suero del caballo No. 2 infectado experimentalmente con el parásito.	23
Fig. 7	Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunolectrotransferencia de los sueros de cerdo y de caballo infectados experimentalmente con <i>Trichinella spiralis</i> .	25
Fig. 8	Valores de densidad óptica (D. O.) de sueros de caballos de rastro obtenidos en el ELISA con antígenos de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	26
Fig. 9	Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunolectrotransferencia de los sueros de caballos de rastro positivos en el ELISA empleando los componentes de excreción/secreción (E/S) de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> .	27
Fig. 10	Análisis electroforético de los productos amplificados del DNA de <i>Trichinella</i> , mediante PCR.	31
Fig. 11	Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunolectrotransferencia de los sueros de caballos de rastro positivos por digestión artificial.	32

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio para analizar la respuesta inmune humoral en caballos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*, con la finalidad de establecer la cinética de aparición de anticuerpos en los animales infectados así como patrones de reconocimiento de antígenos del parásito por estos anticuerpos. En los sueros de caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* se detectó, por ELISA, la presencia de anticuerpos contra el parásito a partir de la 3a semana post-infección (p.i) con un pico a la 5a y 7a semana p.i. El análisis por inmunoelectrotransferencia (IET) de las muestras de suero colectadas de los caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis*, utilizando el extracto total mostró una reactividad hacia componentes de la larva muscular del parásito con peso molecular de 47, 52, 59, 67, 72 y 105 kDa. Este patrón fue muy similar al referido para otras especies animales infectadas con este parásito. Una vez estandarizados los ensayos serológicos se emplearon éstos en paralelo con ensayos de digestión artificial para la detección de *Trichinella* en caballos del rastro 5 de Junio de San Vicente Chicoloapan, Edo México. De las ochenta muestras de músculo analizados se encontraron larvas identificadas por PCR como *T. spiralis*. En los ensayos de ELISA con los sueros de caballos de rastro se obtuvo un 9.7 y 3.6% de positividad empleando los productos de excreción/secreción y los antígenos de superficie/esticosoma de la larva muscular de *T. spiralis* respectivamente. En los análisis de IET con las muestras de suero colectadas del rastro se observó un reconocimiento de antígenos del parásito muy similar a lo reportado con suero de caballos infectados experimentalmente.

INTRODUCCION

La incidencia de enfermedades producidas por organismos helmintos es muy alta a nivel mundial. Estas infecciones tienen un gran impacto en salud pública en varios países del urbe afectando el crecimiento y desarrollo de sus habitantes. Las enfermedades parasitarias en humanos se presentan en forma sub-aguda o crónica y aunque en algunas ocasiones se adquiere protección contra la reinfección, la respuesta inmune inducida es poco efectiva en la eliminación del parásito. Es por esto que se requiere intensificar estudios tanto de biología del parásito como de los mecanismos inmunes y métodos de diagnóstico, prevención y control de estas parasitosis.

En el caso específico de la triquinelosis, ésta es una enfermedad causada por parásitos del género *Trichinella*, y afecta tanto al hombre como a muchos otros animales. En el caso del hombre, éste se infecta al consumir carne contaminada con larvas de diferentes especies de *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nelsoni*, *T. britovi* y *T. nativa*) que se encuentran enquistadas en el músculo estriado de este hospedero. El ciclo de vida de este parásito se inicia cuando las larvas llegan al intestino del hospedero, por acción de los jugos digestivos las larvas se liberan y sufren cuatro mudas hasta madurar a adulto e invaden inmediatamente la mucosa intestinal. Después de la copulación, la hembra expulsa a las larvas recién nacidas, que atraviesan la mucosa intestinal y por vía sanguínea o linfática entran en circulación a todo el organismo. Durante la migración muchas larvas son destruidas y solamente sobreviven aquellas que alcanzan los músculos estriados en donde maduran para convertirse en larvas musculares (Correa y cols., 1980). En este proceso, se presentan alteraciones en las células musculares que dan lugar a la formación de lo que se ha denominado célula nodriza. Esta última estructura mantiene al parásito por tiempo indefinido, almacenando nutrimentos para la misma célula y para la larva muscular (Stewart, 1983) (Fig. 1).

Los síntomas de triquinelosis que se presentan más frecuentemente en humanos dependen del ciclo de vida del parásito. Así, cuando alcanza el estadio de adulto y se establece en la mucosa del intestino, se presentan reacciones inflamatorias, náuseas, diarrea y fiebre. Por otro lado, cuando las larvas recién nacidas pasan al torrente circulatorio se originan brotes febriles, edemas periorbitales y reacciones alérgicas; al penetrar las larvas recién nacidas al músculo esquelético se observan síntomas de toxicidad acompañados de mialgia (Ancelle y cols., 1988; Correa y cols., 1980; Neugebauer, 1983). Cabe señalar que los síntomas varían de acuerdo a la infección con las diferentes especies de *Trichinella* (Tabla 1) (Pozio y cols., 1993; Carneri y cols., 1988).

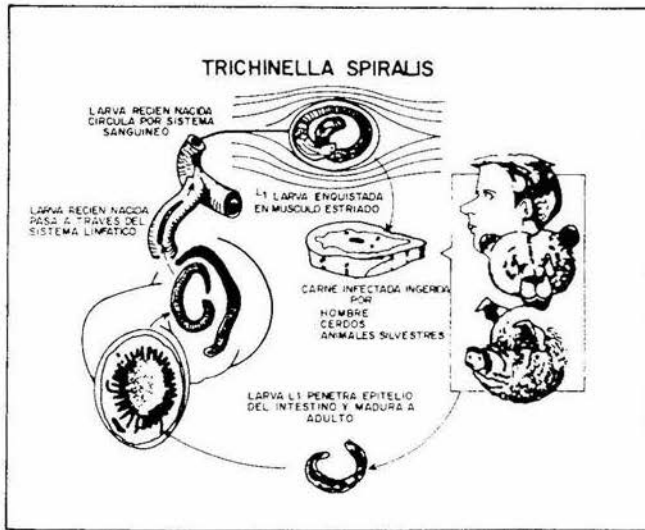


Fig. 1 Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Tomado de Murrell y cols., (1985a).

Tabla 1. Frecuencia de signos clínicos presentados en los tres brotes de triquinelosis humana ocurridos en Francia e Italia ocasionados por el consumo de carne de caballo.

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

Tomado de Carneri y cols., (1988).

Estudios realizados por Martínez-Marañón (1983;1985a) mostraron que en varios estados de la República Mexicana se ha presentado un incremento en los brotes de triquinelosis humana. Así, en el estado de Zacatecas se reportó en un lapso de 7 años, 102 casos de triquinelosis y 158 casos en la recopilación de 10 años en el resto de la República Mexicana (Martínez-Marañón, 1985a,b). En Zacatecas existe el antecedente de que los brotes de triquinelosis han sido causados por la ingesta de carne de chorizo elaborada con carne de cerdo infectada con *T. spiralis*. En uno de los últimos brotes en este estado se demostró que la gente con un rango de edad de 15 a 44 años es el grupo más afectado y que dentro de éste el 51 % ocurrió en mujeres. Asimismo las larvas se detectaron en 6 biopsias musculares (38 %) y en 6 casos por cortes histológicos e inmunoelectroforesis (Cabral-Soto y cols., 1990). Asimismo, en 1992, en Zacatecas se examinaron 600 músculos de diafragmas de

cerdos, observando que el 0.33 % resultaron positivos por el método de compresión directa y 1.33 % por el método de digestión artificial (Contreras y Herrera, 1992). Por otro lado, Chihuahua también es considerado un estado endémico para triquinosis. Uno de los últimos brotes documentados ocurrió en Ciudad Delicias, Chihuahua ocasionado por el consumo de derivados de cerdo. En esta ocasión se involucraron 166 personas y el 88.1 % presentaron resultados positivos por biopsia muscular y 90.3 % por el método de compresión y tinción tisular (Hernández y cols., 1992). Por otro lado, estudios realizados en el estado de San Luis Potosí con muestras de suero de cerdo (1995) revelaron que existe una prevalencia del 1.9 % (Padilla y cols., 1994), argumentando que la falta de control en la crianza, introducción y sacrificio de cerdos favorece el desarrollo de la triquinosis humana.

En los rastros del país, el diagnóstico de triquinosis porcina se realiza mediante triquinoscopia, utilizándose de 0.5 a 0.8 g de carne. Este método tiene una sensibilidad de detección de 3 larvas por gramo de carne analizada (Touratier, 1991) por lo que cerdos que tienen cargas parasitarias bajas no se detectan. En los países europeos, el diagnóstico de la infección se realiza mediante digestión artificial de una mezcla de 30 cerdos de rastro tomando 10 gr de diafragma (van Knapen y cols., 1981) y en Estados Unidos se realiza la determinación a partir de una mezcla de 20 animales de rastro tomando muestras individuales de un mínimo de 5 gr (International Committee of the O.I.E.). Este método tiene una sensibilidad de 1 larva por gramo de músculo (Ruitenberg y cols., 1983).

Con la finalidad de desarrollar métodos de diagnóstico, se ha demostrado la utilidad de diferentes métodos serológicos tales como: hemaglutinación en látex, inmunofluorescencia y ELISA en el diagnóstico de triquinosis porcina (van Knapen y cols., 1981, 1984; Murrell y cols., 1986). De éstos, el ensayo de ELISA permite un diagnóstico sensible de la triquinosis, sin embargo, el empleo de extracto total de *T. spiralis* en el ELISA ocasiona reacciones cruzadas con otros parásitos como: *Ascaris*, *Oesophagostomum* y *Metastrongylus*, lo cual se puede evitar mediante el empleo de antígenos purificados del parásito (Gamble y cols., 1983).

Así, Gamble y cols., (1983) y Murrell, (1985b) utilizaron antígenos de E/S de la larva muscular de *T. spiralis* lo que aumentó tanto la sensibilidad del ELISA (93 %) como la especificidad (92%). Por otra parte, antígenos de S/E purificados mediante una columna de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (Fig. 2) (Ortega-Pierres y cols., 1989) han sido empleados en el diagnóstico de triquinosis tanto porcina como humana, incrementado la especificidad del diagnóstico (Arriaga y cols., 1989, 1991; Salinas-Tobón y cols., 1994c).

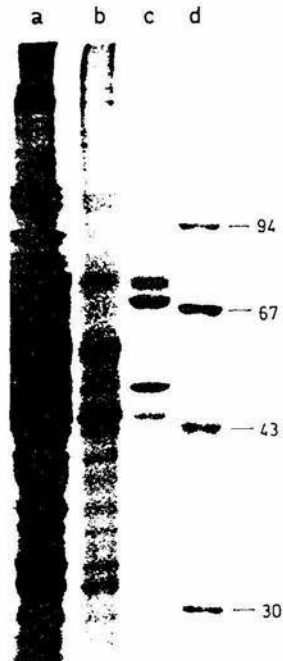


Figura 2. Antígenos de superficie/esthosome (S/E) purificados mediante una columna de afinidad usando el anticuerpo monoclonal NIM-M1; a) extracto total de la larva muscular de *Trichinella spiralis*; b) material no adherido a la columna de afinidad; c) antígenos de S/E; d) marcadores de peso molecular. Tomado de Ortega-Pierres y cols., (1989).

En este contexto, Arriaga y cols., (1989) evaluaron tanto extracto total como antígenos de S/E purificados y productos de E/S de la larva muscular de *T. spiralis* en el diagnóstico de la triquinelosis porcina. Los autores demostraron que al utilizar antígenos purificados del parásito (S/E y E/S) se incrementa la especificidad del ELISA, disminuyendo de esta forma las reacciones inespecíficas.

Asimismo, en este estudio se determinaron mediante IET los principales componentes de la larva muscular de *T. spiralis* que son reconocidos por cerdos infectados experimentalmente con el parásito. Así, se determinó que los sueros de estos animales reconocen cinco proteínas con un peso molecular de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa, las cuales son similares a lo reportado para los componentes de S/E purificados con el anticuerpo monoclonal NIM-M1 (Ortega-Pierres y cols., 1989).

En cuanto a el diagnóstico de triquinelosis humana, la utilización del ELISA permitió detectar anticuerpos en pacientes infectados durante un brote a la 3a, 5a, 7a, 15a y 57a semanas p.i. y los porcentajes de positividad fueron de 25, 94, 100, 100 y 57 respectivamente (Salinas-Tobón y cols., 1994a,b). Por otro lado, durante 19 brotes de triquinelosis humana que involucraron a 367 personas en la República Mexicana se obtuvo por ELISA una positividad del 44 %. En cuanto al patrón de reconocimiento antigénico en humanos, este es similar al reconocido por ratones y cerdos y la respuesta humoral está dirigida principalmente contra componentes de S/E, aunque también se reconocen productos de E/S de la larva muscular (Salinas-Tobón y cols., 1994c).

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

ANTECEDENTES

La carne de cerdo ha sido considerada la principal fuente de infección para el humano, ocasionalmente se han reportado brotes causados por carne de otros animales como el oso, morsa, jabalí y camello (Ramisz, 1985,1988; Pozio y cols., 1993; van Knapen y Franchimont, 1988). Sin embargo, los brotes de triquinosis humana más importantes ocurridos en los últimos años, han sido atribuidos al consumo de carne de caballo infectada con el parásito. Estos últimos brotes han involucrado a más de 2,500 personas y han sido ocasionados por 3 diferentes especies de *Trichinella*: *T. spiralis*, *T. britovi* y el genotipo T5 (Tabla 2) (Ancelle y cols., 1985, 1986, 1988; Carneri y cols., 1988; Dick y cols., 1990; Dupouy-Camet y cols., 1994; van Knapen y Franchimont, 1988). La visualización directa de larvas de *Trichinella* en la carne de caballo consumida en estos brotes no se ha realizado, la identificación de la especie de *Trichinella* relacionada en cada brote se ha llevado a cabo empleando biopsias de pacientes involucrados en dichos brotes así como de animales domésticos que consumieron la carne de caballo infectada con el parásito. Considerando estos acontecimientos se propusieron estrategias para prevenir infecciones en humanos ocasionados por el consumo de carne de caballo. Así, se adoptó la inspección de carne de caballo mediante el método de digestión artificial, no sólo en los países donde se han descrito los brotes sino también en países exportadores de carne de caballo en el este de Europa (Ramisz y Balicka, 1994).

La vía natural por la cual un animal herbívoro como el caballo adquiere la infección con *Trichinella* se desconoce, sin embargo existen evidencias que indican que ésta puede ser a través del alimento contaminado con carne infectada con el parásito (Dupouy-Camet y cols., 1994). A nivel experimental diferentes investigadores han demostrado que es posible infectar experimentalmente a caballos con varias especies de *Trichinella* (*T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. spiralis*), y que *T. spiralis* es la especie con mayor adaptación en el caballo (Polidori y cols., 1988; Soulé y cols., 1988,1989,1993a). En estos estudios, los caballos fueron infectados con diferente número de larvas musculares (5000, 10000, 20000 y 50000), determinándose que existe una relación entre la dosis de larvas y los niveles específicos de anticuerpos dirigidos contra el parásito.

Así, Polidori y cols., (1988) reportaron en un caballo infectado experimentalmente con 10,000 larvas musculares de *T. nelsoni*, un incremento en los niveles de anticuerpos contra el parásito entre la 4a y 8a semana p.i. evidenciándose un decremento a la 12a semana. Sin embargo, en caballos infectados con 50,000 larvas musculares de *T. nativa* se demostró la presencia de anticuerpos contra el parásito a partir de la 3a semana (Soulé y cols., 1989),

observándose una disminución en los niveles de anticuerpos a partir de la 7a semana p.i. Cabe señalar que Soulé y cols., (1993a,b) al realizar una reinfección con la misma dosis inicial (20,000 larvas musculares de *T. spiralis*), observaron que el caballo eliminó más rápidamente las larvas musculares, alcanzándose un pico en el nivel de anticuerpos al día 33 p.i. Si bien en estos estudios se ha analizado la respuesta humoral hacia *T. spiralis*, aún queda por definir qué componentes del parásito son reconocidos por los sueros de caballo infectados experimental y naturalmente con *Trichinella*.

En relación con los estudios realizados con caballos provenientes de rastro, diferentes autores (Battelli y cols., 1994; van Knapen y Franchimont, 1988; Virga y cols., 1994) indican que serológicamente es posible detectar anticuerpos dirigidos contra *Trichinella* en sueros de estos animales, siendo alta la prevalencia de triquinelosis equina (1.6 a 6 %), sin embargo, estos resultados difieren de los obtenidos por digestión artificial ya que se han analizado miles de muestras y en la mayoría de los casos no se han detectado larvas (Dupouy-Camet y cols., 1994).

Tabla 2. Brotes de triquinelosis humana ocurridos en Italia y Francia de 1975 a 1993, ocasionados por el consumo de carne de caballo.

Año	Lugar	Num. de casos	Origen del caballo	Tipo de aislado
1975	Bagnolo in Piano, Italia	89	Yugoslavia	<i>T. britovi</i>
1975	Chatenay-Malabry, Francia	125	Europa del Este	---
1984	Varese, Italia	13	Yugoslavia	---
1985	Paris y Melun, Francia	431	Estados Unidos	<i>T5</i>
1985	Paris y 10 focos en Francia (Polonia ?)	642	Este de Europa	<i>T. spiralis</i>
1986	Salsomaggiore, Italia	>300	Este de Europa	<i>T. britovi</i>
1991	Barletta, Italia	>500	Este de Europa	<i>T. spiralis</i>
1991	Clermont-Ferrand, Francia	21	Estados Unidos	---
1993	Paris, La Rochelle y 2 focos en Francia	538	Canadá	<i>T. spiralis</i>

Tomado de Dupouy-Camet y cols., (1994).

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

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

Es importante mencionar que en países europeos el ELISA se realiza empleando extracto total de la larva muscular, sin embargo, sería conveniente realizar el diagnóstico de triquinelosis equina con antígenos del parásito purificados como los antígenos de S/E y los de E/S de la larva muscular, cuya utilidad en el diagnóstico de triquinelosis porcina y humana ha sido ampliamente demostrada, permitiendo el diagnóstico sensible y específico de la infección (Arriaga y cols., 1989,1991; Gamble, 1985a; Salinas-Tobón y cols., 1994a,b).

En México como en otros países el consumo de carne de caballo se da a varios niveles (tanto humano como para animales en cautiverio y domésticos) y no existe información sobre la frecuencia de triquinelosis en caballos, ya que con excepción de los rastros TIF (Tipo Inspección Federal), no se realiza ningún tipo de inspección para determinar la presencia de larvas de *Trichinella* en caballos de rastros. Sin embargo, considerando que por lo menos 35 % de la producción de estos rastros es destinada al consumo humano, es importante contar con métodos de diagnóstico que permitan conocer de manera precisa la frecuencia de esta parasitosis en los caballos de rastro. Para ello, se pueden emplear diferentes estrategias para la detección de posibles infecciones en caballos de rastro que pueden incluir el empleo de ensayos serológicos (ELISA e IET) y de métodos directos para la detección de los parásitos (digestión artificial o triquinoscopia).

JUSTIFICACION

En nuestro país la carne de caballo se usa principalmente para consumo de animales como perros y animales del zoológico, pero parte de la producción es utilizada para consumo humano. Considerando el hecho de que se han reportado brotes de triquinosis humana causados por consumo de carne de caballo en Europa, resulta de suma importancia evaluar la incidencia de triquinosis equina en nuestro país. Esto puede lograrse empleando ensayos serológicos estandarizados que sean sensibles y confiables como el ELISA e IET. Asimismo se pueden emplear métodos directos como triquinoscopia y digestión artificial que permitan confirmar la presencia del parásito.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune humoral en caballos infectados natural y experimentalmente con larvas musculares de *Trichinella spiralis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estandarizar la prueba de ELISA para detección de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en caballos infectados natural y experimentalmente con el parásito.

Determinar la cinética de aparición de anticuerpos en caballos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*.

Identificar los antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* reconocidos por caballos infectados experimentalmente con el parásito.

Evaluar el ensayo de ELISA estandarizado con sueros de caballos colectados del rastro 5 de Junio de San Vicente Chicoloapan, Edo. de México.

MATERIAL Y METODOS

1.- MANTENIMIENTO DEL CICLO DE VIDA Y OBTENCION DE LARVAS MUSCULARES DE *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida de *T. spiralis* se mantuvo en ratones BALB/c, los cuales se infectaron con 800 larvas musculares de *T. spiralis* por vía intragástrica. La obtención de larvas musculares se realizó según lo recomendado por Dennis y cols., (1970). Ratones BALB/c infectados con *T. spiralis* se sacrificaron, se les quitó la piel, las extremidades, las vísceras y el músculo esquelético se digirió con una solución de Pepsina-Acido Clorhídrico (HCl) al 1 % por 3 hrs a 37 °C, en agitación constante. Posteriormente, la solución se pasó por una tamiz de 137 µm y se procedió a sedimentar las larvas las cuales se colocaron en tubos Falcon de 15 ml. Las larvas se lavaron tres veces con amortiguador de fosfatos salino (PBS) (apéndice A) pH 7.3 en una centrifuga clínica (Damon IEC/Division, EUA) a 3250 g por 3 min. Las larvas musculares obtenidas se resuspendieron en agar suave al 0.2 % y se tomaron 5 alícuotas de 10 µl para determinar el número de parásitos.

2.- OBTENCION DEL EXTRACTO TOTAL DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

El extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* se obtuvo de acuerdo al método descrito por Parkhouse y cols., (1981). La extracción se hizo a partir de un paquete de 0.5 ml de larvas musculares, las cuales se resuspendieron en 1 volúmen de Tris 20 mM pH 8.3 conteniendo inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM diluido en isopropanol, TLCK 25 g/ml diluido en agua, TPCK 50 µg/ml diluido en etanol). La homogenización se llevó a cabo por 30 min en un homogenizador de vidrio (Potter Wheaton) en un baño de hielo. Posteriormente se añadió desoxicolato de sodio (DOC) al 4 % y se homogenizó 20 min más y se dejó reposar 30 min a T. A. El extracto se centrifugó a 13,500 g por 30 min a 4 °C en una centrifuga eppendorf (modelo 5415 C, Alemania). El sobrenadante se guardó a 4 °C para su posterior cuantificación de proteínas y purificación de los antígenos de S/E.

3.- PURIFICACION DE LOS ANTIGENOS DE SUPERFICIE/ESTICOSOMA DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

Los componentes de S/E de la larva muscular de *T. spiralis* se purificaron mediante una cromatografía de afinidad empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 acoplado a Sefarosa 4B. El método que se utilizó es el descrito por Parkhouse, (1984). Se utilizó un volumen de 5 ml de Sefarosa 4B anticuerpo monoclonal NIM-M1 y se empacó en una columna de 1.3 x 30 cm (Bio Rad, Hércules, CA. EUA). Posteriormente se lavó con un volumen de amortiguador alkali-strip (Dietilenamina 50 mM, DOC al 2 %, pH 11.5) y se equilibró con varios volúmenes de amortiguador de columna (Tris-HCl 20 mM, DOC al 0.5 % pH 8.3) hasta que el pH de la resina fue igual al de la solución. Aproximadamente 20 mg del extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* se centrifugó a 120,000 g en una microcentrífuga (Air -Fuge, Beckman, Palo Alto, CA. EUA) para eliminar los residuos. Posteriormente, el sobrenadante se pasó por la columna tres veces y ésta se lavó con amortiguador de columna hasta que se obtuvo una densidad óptica (D.O.) de cero midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (DU-65, Beckman, Palo Alto, CA. EUA) a 280nm. Posteriormente se eluyó el antígeno retenido en la columna con dos volúmenes de amortiguador de pre-strip (Glicina 50 mM, DOC al 2 % pH 9.3), aquellas fracciones que dieron lecturas en el espectrofotómetro a 280 nm se colectaron. Posteriormente se pasaron 2 ó 3 volúmenes de amortiguador Alkali-strip hasta que los valores de D.O. de las fracciones fueran cero. Las muestras se neutralizaron inmediatamente empleando Tris-HCl 1 M pH 8.3 y se leyó su absorbancia a 280 nm. Las fracciones que tuvieron valores altos de D.O. se juntaron y se dializaron extensivamente contra solución de Tris-HCl 20 mM, pH 8.3. La concentración de proteínas en las muestras colectadas se determinó por el método de Lowry y cols., (1951) modificado. En algunos casos en requirió concentrar las muestras para lo cual se empleó Aquacide (Calbiochem, San Diego, CA. EUA).

4.- CUANTIFICACION DE LAS PROTEINAS LOS EXTRACTOS TOTALES Y PURIFICADOS DE LA LARVA MUSCULAR DE *Trichinella spiralis*

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

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
a)ASB (µl)	-	10	20	40	60	80	100	-
H ₂ O (µl)	500	490	480	460	440	420	400	490
Muestra (µl)	-	-	-	-	-	-	-	10
b)Detergente (µl)	50	50	50	50	50	50	50	50
c)Sol. E (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

a) Volúmenes tomados a partir de un Stock de ASB (1mg/ml)

b) Solución de DOC al 10 %

c) Solución preparada a partir de mezclar 1 volumen de sulfato de cobre pentahidratado al 0.5 % y 1 volumen de tartrato de sodio y potasio al 2 %, más 50 volúmenes de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio al 0.1 N.

Se mezcló el contenido de cada tubo y se dejó reposar 10 min a T. A. Posteriormente a cada tubo se le adicionaron 250 µl del reactivo de Folín-Ciocalteus (Merck, Darmstadt, Alemania) diluido 1:2 y 500 µl de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 5 %. Los tubos se agitaron en un vortex y se incubaron por 30 min a T. A. Una vez realizado esto se leyó la absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro DU-65, Beckman. La concentración de proteínas de los extractos totales y purificados se calculó por interpolación con la curva patrón de Albúmina.

5.- INFECCION EXPERIMENTAL DE LOS CABALLOS

Los caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* se mantuvieron en el Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SARH. Previo a la infección, los caballos se desparasitaron con una dosis única de Panacur (Lakeside, Alemania) (20 mg/Kg). Tres caballos de edad adulta, se anestesiaron con ROMPUN (1 mg/kg) y posteriormente dos caballos se inocularon por vía intragástrica con 40,000 (caballo No. 1 y 2) uno con 30,000 (caballo No. 3) larvas

musculares de *T. spiralis* resuspendidas en agar suave (0.2 %). Como control negativo se utilizó un caballo, el cual no se infectó con el parásito (caballo No 4). Una vez realizada la infección se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos para obtener el suero y una vez colectado éste se guardó a -20 °C para su posterior utilización en los ensayos de ELISA e IET. Los animales se sacrificaron a la semana 27 y se colectaron muestras de diafragma, lengua, macetero (derecho e izquierdo), corazón, cuello y pierna de estos animales que fueron digeridas por el método artificial descrito anteriormente.

6.- MUESTRAS DE SUERO Y DE DIAFRAGMA DE ANIMALES DE RASTRO

Se obtuvieron 83 muestras de sangre, y sólo de 9 de estos animales se obtuvieron también muestras de diafragma en 4 de ellas se encontraron larvas de *Trichinella*, por lo que en un segundo muestreo se colectaron 71 muestras de diafragmas de caballos del rastro 5 de Junio de San Vicente Chicoloapan del Edo. de México, (trabajo en colaboración con el MVZ Arturo Adame López) al cual se sabe que llegan caballos de diferentes regiones de la República Mexicana. El suero de estos animales se obtuvo y se almacenó a -20 °C para su posterior utilización en los ensayos inmunoenzimáticos. Las muestras de diafragmas se procesaron mediante digestión artificial de acuerdo al método descrito por Dennis y cols., (1970).

7.- DIGESTION ARTIFICIAL

Las muestras de diafragma de los caballos de rastro, así como de lengua, macetero, diafragma, cuello, corazón y pierna de los caballos infectados experimentalmente, se digirieron artificialmente con pepsina-HCl al 1 % de acuerdo a la metodología descrita por Dennis y cols., (1970). Aproximadamente 100 gr de carne de los caballos infectados experimentalmente y de 22 a 37 gr de las muestras de diafragma de rastro se digirieron artificialmente.

8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA BAJO CONDICIONES REDUCTORAS

El extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* se separó electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS. Los geles se prepararon de acuerdo a lo recomendado por Laemmli, (1970) (apéndice B). Se utilizó una cámara de electroforesis miniprotean (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA. EUA). Para la preparación de los geles se colocó el gel espaciador al 10 % entre los dos vidrios, inmediatamente se

adicionó 1 ml de isopropanol para que polimerizara uniforme el gel. Después se lavó y se colocó un peine ciego, adicionándose el gel concentrador al 5 %. A 500 mg del extracto total de *T. spiralis* se le agregó amortiguador de muestra (apéndice B) y β -mercaptoetanol (Bio Rad, Richmond, CA. EUA), se hirvieron por 3 min y se cargaron los geles. Estos se corrieron con amortiguador de corrida (apéndice A) a 100 volts hasta que la muestra entró al gel espaciador, después de lo cual se aumentó el voltaje a 140 volts y se dejó correr por espacio de 2 hr.

En el análisis electroforético se incluyeron marcadores de bajo peso molecular (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia): fosforilasa b (94 kDa), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carboxilasa (30 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y lactoalbúmina (14 kDa). Una vez transcurrido el corrimiento electroforético los geles se tiñieron con azul de Coomassie al 0.1 % y se destiñeron posteriormente con ácido acético al 7.5 % y metanol al 50%.

9.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

Una vez realizada la separación electroforética del extracto total de la larva muscular de *T. spiralis*, las proteínas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa (Bio Rad, Richmond, CA. EUA), empleando filtros Whatman del No. 3 y fibras scotch brite (apéndice C) de acuerdo a lo recomendado por Towbin y cols., (1979). El gel de poliacrilamida-SDS se equilibró en amortiguador de transferencia (apéndice A) por 30 min a T. A. con cambios de solución cada 15 min. La transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa se llevó a cabo en una cámara de transferencia (Hoefer, Scientific Instruments, San Francisco, CA. EUA) a 100 volts durante 1 hr a 4 °C. Después de la transferencia, se cortó la tira de papel de nitrocelulosa en donde se encontraban transferidos los pesos moleculares y se tiñó con Negro Amido al 0.1 %, durante 3 min y posteriormente se destiñó con una solución con ácido acético al 7.5 % y metanol al 50 %. El resto del papel se bloqueó con una solución de PBS-ASB al 3 % a 4 °C toda la noche. Una vez realizado lo anterior, se cortó el papel en tiras de 4 mm. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron toda la noche a 4 °C con las muestras de sueros de los caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* colectados a diferentes intervalos p. i. en una solución de incubación que contenía: 100 μ l de PBS (10x), 100 μ l de STD y 100 μ l de la solución stock 10x (apéndice A) en agitación constante en un agitador de balanceo (Hoefer, Scientific Instruments, San Francisco, CA. EUA). Los sueros se probaron a diferentes diluciones (1:50, 1:100 y 1:250) y como control se incluyó un suero de caballo no infectado a las mismas diluciones. Posteriormente las tiras se lavaron 3 veces por 10 min con PBS-tritón (X-100) al 1 %. En seguida se adicionó el conjugado conejo anti Ig Gs

caballo acoplado a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO. EUA) diluido en PBS-STD 10 % a diferentes diluciones (1:4000, 1:5000 y 1:6000). Las tiras se incubaron 2 hrs a 37 °C en agitación constante. Posteriormente se hicieron los lavados descritos con anterioridad y se agregó la solución de sustrato (20 ml de PBS, 4 ml del stock (4-cloro-1-naftol en metanol absoluto:3 mg/ml) y 8 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30 %) dejándose aproximadamente 10 min, parándose la reacción con agua. Posteriormente las muestras de suero de caballos infectados experimentalmente colectados a diferentes días p.i. se analizaron por IET diluidas 1:250 y el conjugado 1:6,000. Por otro lado, los sueros de caballos de rastro se emplearon a una dilución 1:10 y el conjugado 1:3000.

10.- ELISA

El ELISA se realizó siguiendo el método descrito previamente por Arriaga y cols., (1989). Para estandarizar el ensayo se seleccionaron algunas de las muestras de suero colectadas de los caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis*, diluidas 1:500 y 1:1,000. Las placas de ELISA (Nunc-Immuno Plate, Inter Med, Dinamarca) se sensibilizaron con el extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* a una concentración de 20 mg/ml en amortiguador de carbonatos (apéndice A). El acoplamiento se llevó a cabo incubando la placa por toda la noche a 4 °C, y posteriormente los sitios en los que no se adhirió el antígeno se bloquearon con PBS-Tween-20 al 0.5 % y ASB 0.5 % a T. A. por 1 hr. Los sueros se diluyeron en PBS-Tween-20 al 0.5 % y ASB 0.5 % y se incubaron 1 hr a 37 °C. Posteriormente la placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0.5% durante 3 min 3 veces, enseguida se agregaron 100 µl del conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO. EUA) diluido 1:10,000 en PBS-ASB (0.5 %)-Tween 20 (0.5%). La placa se incubó 1 hr a 37 °C y posteriormente se lavó con PBS-Tween-20 (0.5 %) como anteriormente se mencionó. Una vez realizado lo anterior, se adicionaron 200 µl por pozo de amortiguador citrato-fosfato (apéndice B) con 4 mg/ml de o-fenilendiamina y 4 µl de H₂O₂ al 30% y se dejó desarrollar el color por 7 min. La reacción se paró adicionando 50 µl de H₂SO₄ 2.5 M. La D.O. se leyó a 492 nm en el lector de ELISA (Biotek, Inc, Wisnooski, VT. EUA). Una vez estandarizado el ensayo de ELISA se analizó la cinética de aparición de anticuerpos dirigidos contra *T. spiralis* en las muestras de sueros de caballos infectados experimentalmente colectadas a diferentes intervalos p.i. diluidas 1:1,000. El ELISA empleando sueros de caballos de rastro se llevó a cabo utilizando una dilución 1:400 y como fuente de antígeno se usó el extracto total, los antígenos de S/E y productos de E/S de la larva muscular de *T. spiralis* a una concentración de 20 µg/ml, 10 µg/ml y 5 µg/ml respectivamente. Los sueros con valores de D.O. más altos que la media de los 14 sueros

negativos más tres desviaciones estandar se consideraron positivos. Los antígenos de E/S fueron amablemente donados por el Dr. H. R. Gamble del Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

11.- CARACTERIZACION MORFOLOGICA E IDENTIFICACION DE ESPECIE DE *Trichinella*

Las larvas musculares obtenidas del diafragma de caballos de rastro se estudiaron con un microscopio de interferencia de luz a 1000 x. Las larvas musculares se identificaron en nuestro laboratorio y en el de los Drs. Zarlenga y Lichtenfels a nivel de género de acuerdo a las características descritas por Kozek, (1975). La identificación a nivel de especie de las larvas obtenidas se realizó por el Dr. Zarlenga (en el Laboratorio de Parasitología Biosistemática en Beltsville, Maryland, EUA) empleando PCR. La metodología utilizada es la descrita por Zarlenga y Dame, (1992).

RESULTADOS

Con la finalidad de determinar mediante ELISA e IET la presencia de anticuerpos dirigidos en contra de *T. spiralis* en muestras de sueros obtenidos del rastro 5 de junio de San Vicente Chicoloapan, Edo. de México, se procedió a la estandarización de estos métodos. Para esto, se colectaron muestras de sueros de caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis* obtenidos a diferentes intervalos p.i. En el ELISA se empleó como fuente de antígeno un extracto total de la larva muscular el cual fue obtenido de acuerdo a lo recomendado por Parkhouse y cols., (1981). El análisis electroforético del extracto mostró la presencia de proteínas con un peso molecular de 20 a más de 200 kDa. (Fig. 3). En este el ELISA se utilizó una concentración de 20 µg/ml del extracto total y las muestras de suero del caballo experimental No. 1, diluidas 1:500 y 1:1,000. Como puede observarse en la Fig. 4, las lecturas de D.O. a 492 nm obtenidas con las 2 diluciones son muy semejantes, por lo que se eligió la dilución 1:1,000 para determinar la cinética de aparición de anticuerpos contra *T. spiralis* en todas las muestras de los sueros colectadas de los 3 caballos infectados experimentalmente con el parásito. En la Fig. 5 se puede observar que a partir de la 3a semana p.i. se detectó la presencia de anticuerpos contra el parásito, alcanzándose un pico a la 5a y 7a semana p.i., el nivel de anticuerpos se mantuvo hasta la 10a semana p.i. para posteriormente decrecer hacia la semana 18 p.i. manteniéndose un título bajo de anticuerpos hasta la semana 27 p.i. En el control negativo los valores de D.O. se mantuvieron bajos en el transcurso del experimento.

Por otro lado, el análisis de IET se estandarizó empleando el suero colectado del caballo experimental No. 1 infectado con *T. spiralis* a la 3a semana p.i., a varias diluciones (1:50, 1:200 y 1:250). Para análisis posteriores se eligió la dilución 1:250 debido a que en esta dilución se observaron las bandas reconocidas por el suero con mayor nitidez y el fondo disminuyó. Empleando esta dilución, se analizaron todas las muestras del suero colectadas del caballo No. 1 desde el día 0 y hasta la 27 semana p.i. Como puede observarse en la figura 6a a partir de la 5a semana p.i. y hasta la semana 19 p.i. existe un reconocimiento mayoritario de moléculas del parásito con pesos moleculares de 47, 52, 59, 67, 72 y 105 kDa. Cuando las mismas muestras de suero se analizaron empleando una dilución 1:50, se observó que a la semana 3, 24 y 27 p.i. hubo reactividad hacia las moléculas reconocidas por las otras muestras de suero a la dilución 1:100 (resultados no mostrados). Como control se incluyeron sueros obtenidos del caballo no infectado a diferentes semanas p.i. no observándose reconocimiento de componentes del parásito (Fig. 6b).

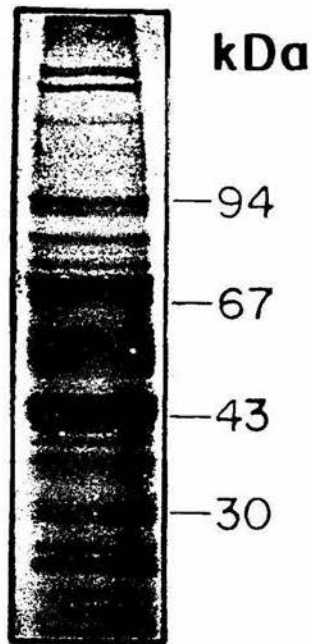


Fig. 3. Análisis electroforético del extracto total de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. Los componentes del extracto total de la larva muscular del parásito se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida al 10 % en presencia de SDS (bajo condiciones reductoras). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie de acuerdo a lo descrito. Los marcadores de peso molecular empleados como estandar se indican en kDa a la derecha de la figura.

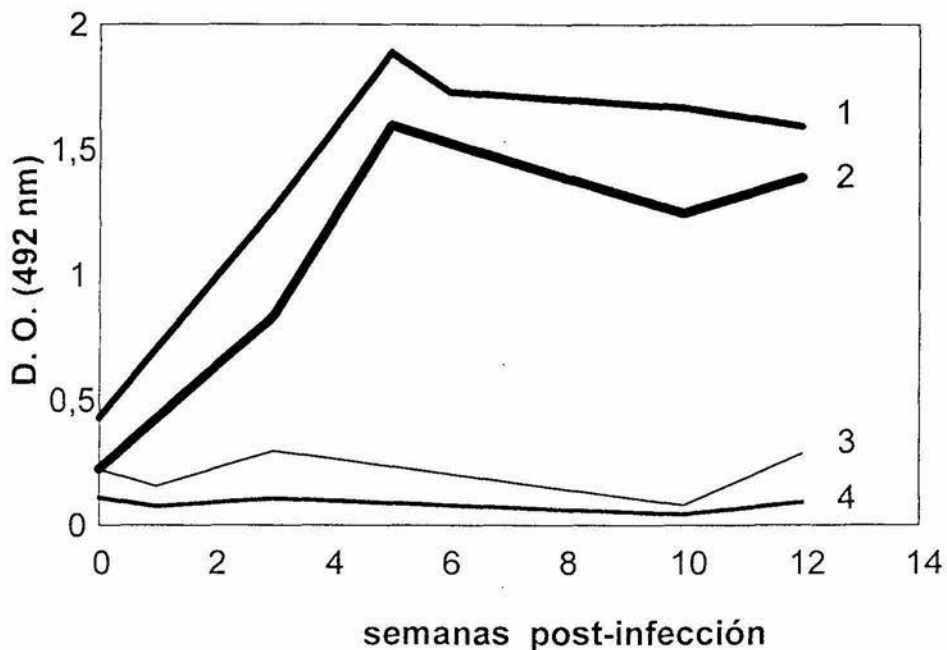


Fig. 4. Cinética de detección de anticuerpos determinados por ELISA dirigidos contra *Trichinella spiralis* en sueros del caballo (No. 1) infectado experimentalmente con el parásito. Las muestras de los sueros del caballo infectado se colectaron a diferentes semanas p.i. y se diluyeron 1:500 (1) y 1:1,000 (2) y del caballo no infectado se diluyeron 1:500 (3) y 1:1,000 (4). El conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa se usó a una dilución de 1:10,000.

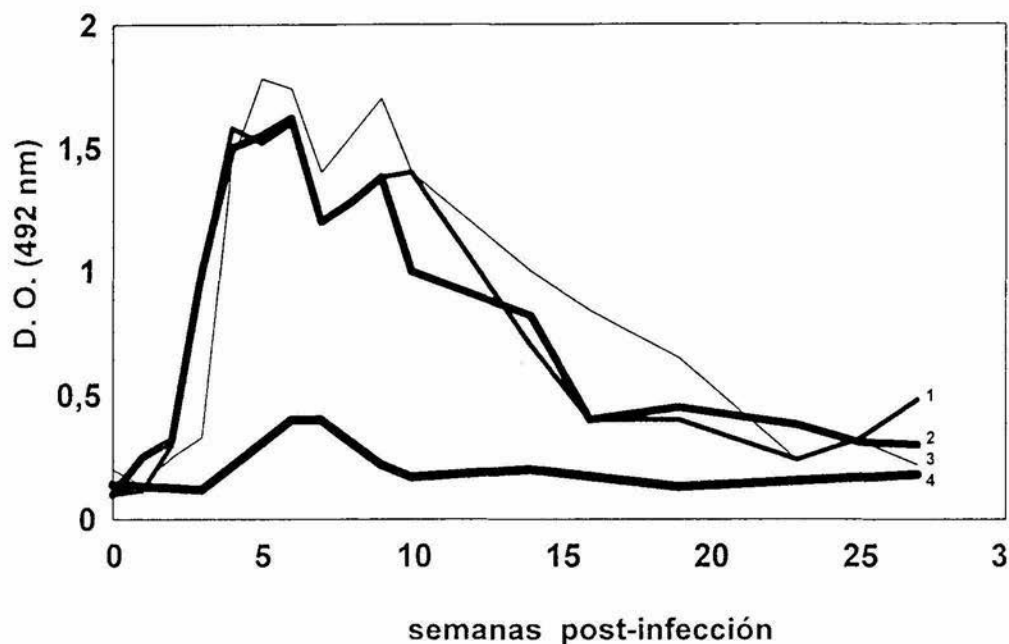
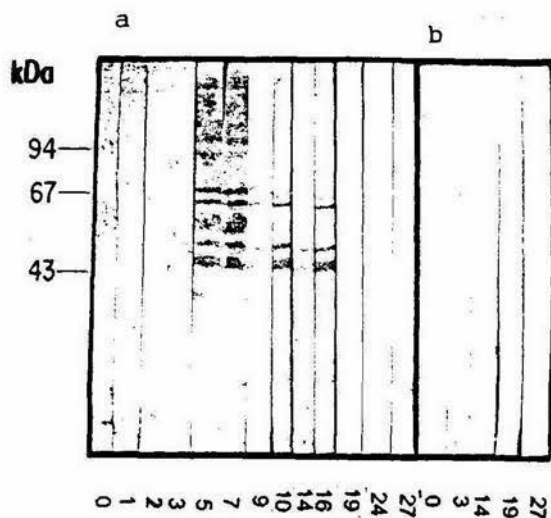


Fig. 5. Cinética de detección de anticuerpos determinados por ELISA dirigidos contra *Trichinella spiralis* en sueros de caballos infectados experimentalmente con el parásito. Las muestras de los sueros de los caballos infectados con 40,000 larvas musculares (1 y 2) y con 30,000 larvas musculares de *T. spiralis* (3) y del caballo no infectado (4) con el parásito se colectaron en el tiempo 0 y hasta la semana 27 p.i. Las muestras de sueros se analizaron por ELISA empleando una dilución de 1:1,000 y el conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa se usó a una dilución de 1:10,000.



Semanas post-infección

Fig. 6. Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunoelectrotransferencia de los componentes de la larva muscular de *Trichinella spiralis* por sueros del caballo No. 2 infectado experimentalmente con el parásito. Los componentes del extracto total de *T. spiralis* se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Los sueros del caballo infectado experimentalmente (panel a) y del caballo no infectado (panel b) se incubaron a una dilución 1:250 con tiras de PNC. El conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa se uso diluído 1:6000. Los marcadores de peso molecular empleados como estandar se indican en kDa a la izquierda de la figura.

Al compararse por IET la reactividad del suero de caballo No. 1 y de un suero de cerdo infectado con el parásito hacia componentes de la larva muscular de *T. spiralis* y *T. nativa*, se observó que ambos sueros tienen el mismo patrón de reconocimiento (Fig 7). Asimismo, es evidente que los sueros reconocen moléculas similares de los 2 extractos con excepción de una proteína de 72 kDa, la cual fue reconocida en el extracto de *T. spiralis* no siendo así con *T. nativa*.

Con respecto a la determinación por ELISA de la presencia de anticuerpos específicos contra *T. spiralis* en sueros de caballos de rastro, éstos se emplearon a una dilución 1:400 y se probaron tres preparaciones antigénicas: extracto total, antígenos de S/E y productos de E/S (Fig. 8). En este ensayo, el punto de corte obtenido fue de 0.386 con el extracto total, 0.328 con los antígenos de S/E y 0.178 con los productos de E/S. El porcentaje de positividad fue de 6.02, 3.61 y 9.67 para el extracto total de la larva muscular (Fig. 8a), antígenos de S/E (Fig. 8b) y los productos de E/S (Fig. 8c) de la larva muscular de *T. spiralis* respectivamente.

El análisis de IET de las 8 muestras de suero de rastro positivas por ELISA con los productos de E/S mostró el reconocimiento mayoritario de componentes de la larva muscular con pesos moleculares de 47, 52, 59, 67, 72 y 105 kDa (Fig 9a) los cuales son similares a lo reportado para los antígenos de S/E, de la larva muscular del parásito (Ortega-Pierres y cols., 1989). Como controles se incluyeron muestras de sueros considerados como negativos en el ELISA, los cuales no presentaron reactividad hacia los componentes de superficie de la larva muscular (Fig 9b).

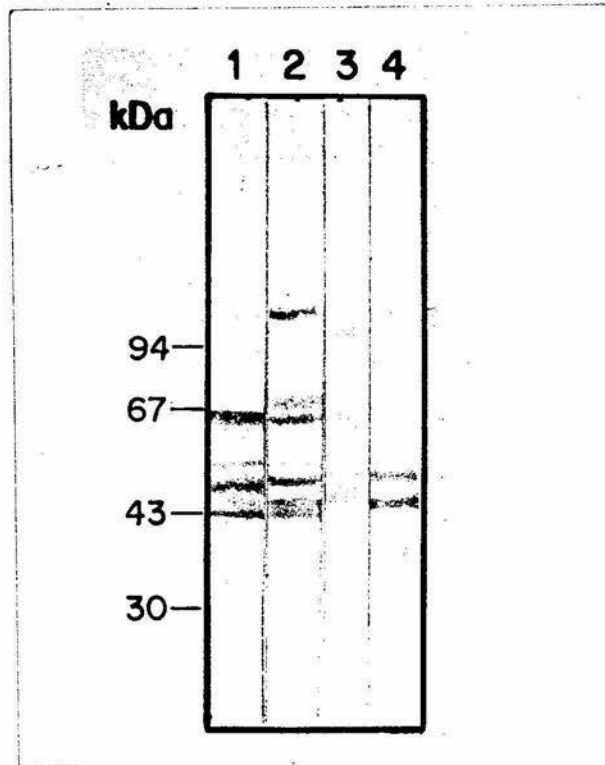


Fig. 7. Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por Inmunoelctrotransferencia de los sueros de cerdo y de caballo infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis*. Los componentes del extracto total de *T. nativa* (carril 1 y 4) y de *T. spiralis* (carril 2 y 3) se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS y se transfirió a papel de nitrocelulosa (PNC). Los sueros de cerdo (carril 1 y 2) y de caballo (carril 3 y 4) infectados con el parásito se diluyeron 1:50 y 1:250 respectivamente y se reaccionaron con las tiras de PNC. El conjugado conejo anti Igs de cerdo acoplado a peroxidasa se usó diluído 1:2,000 (carril 1 y 2) y conejo anti Ig G de caballo acoplado a peroxidasa se usó diluído 1:6,000 (carril 3 y 4). Los marcadores de peso molecular empleados como estandar se indican en kDa a la izquierda de la figura.

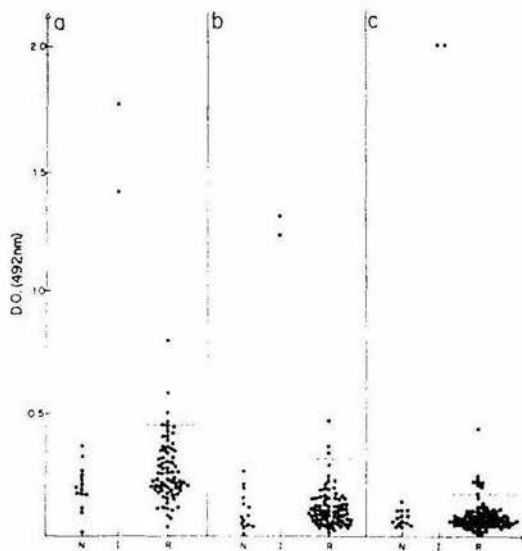


Fig. 8. Valores de densidad óptica (D. O.) de sueros de caballos de rastro (R) obtenidos en el ELISA con antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. a) Extracto total; b) antígenos de superficie/estecosoma; c) productos de excreción/secreción. Como controles (N) se incluyeron sueros de caballos negativos por inmunoelectrotransferencia (IET), suero del caballo No.1 infectado experimentalmente con *T. spiralis* (I). La línea punteada indica el punto de corte calculado considerando la media de los valores de D.O. obtenidos con sueros que en el ensayo de IET resultaron negativos, más tres desviaciones estándar.

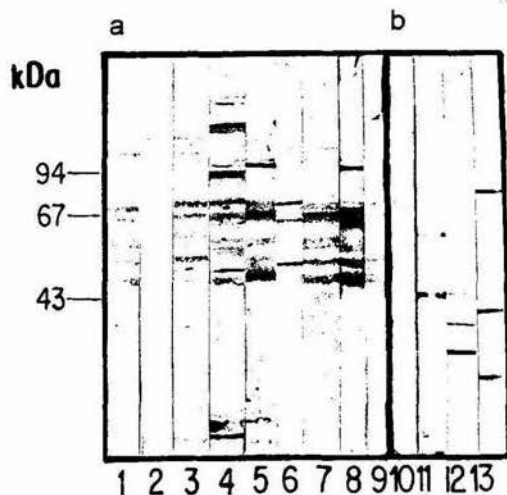


Fig. 9. Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunoelectrotransferencia de los sueros de caballos de rastro positivos en el ELISA empleando los productos de excreción/secreción (E/S) de la larva muscular de *Trichinella spiralis*. Los componentes del extracto total de *T. spiralis* se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10 % en presencia de SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Los sueros de caballos de rastro se diluyeron 1:10 y se reaccionaron con las tiras de PNC; el conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa se usó diluido 1:3,000; panel a, carril 1, caballo No. 2 infectado experimentalmente con *T. spiralis*; carriles del 2 al 9, sueros de caballos positivos en ELISA usando los productos de E/S; panel b, carriles del 10 al 13, sueros de caballos negativos en ELISA. Los marcadores de peso molecular empleados como estandar se indican en kDa a la izquierda de la figura.

Por otro lado, al realizarse la digestión artificial de los diferentes músculos de los tres caballos infectados experimentalmente con *T. spiralis*, se detectó la presencia del parásito principalmente en diafragma, lengua y macetero (Tabla 3). Sin embargo, hubo diferencias importantes en el número de larvas obtenidas en los 3 caballos.

Tabla 3. Número de larvas/gramo detectadas en diferentes músculos de los caballos infectados experimentalmente con *Trichinella spiralis* determinado por digestión artificial.

Caballo	1	2	3
Diafragma	16.376	---	---
Lengua	14.780	0.674	0.250
Macetero der.	0.082	0.420	---
Macetero izq.	0.294	0.050	---
Pierna	---	---	---
Corazón	---	---	---
Cuello	---	---	---

Se digirieron 100 gr de cada músculo siguiendo la metodología descrita por Dennis y cols., (1970).

En relación con las 9 muestras de diafragma de rastro (obtenidas del primer muestreo) digeridas artificialmente con Pepsina-HCl, en 4 de ellas se encontraron larvas las cuales se identificaron morfológicamente como *Trichinella* (5 %). Las larvas/gramo obtenidas de estas muestras varió de 1.8 a 0.8 (Tabla 4). Las larvas recuperadas de la muestra 106 se inocularon a un ratón BALB/c, sin embargo al digerir la carne a los 28 días p.i., no se recuperaron larvas musculares. En otro muestreo posterior realizado en colaboración con Arturo Adame se obtuvieron otras 71 muestras de diafragma y todas fueron negativas por digestión artificial.

Tabla 4. Número de larvas/gramo detectadas en el diafragma de caballos de rastro determinado por digestión artificial.

No. de suero	Larvas/gramo	Identificación	
		Morfología	PCR
84	1.8	<i>Trichinella</i>	<i>T. spiralis</i>
106	1.6	(Se inoculó en 1 ratón)	
108	1.0	<i>Trichinella</i>	---
122	0.8	<i>Trichinella</i>	<i>T. spiralis</i>

Se digirieron de 22 a 37 gr de diafragma de los 80 caballos de rastro de acuerdo a lo descrito por Dennis y cols., (1970). Las larvas se cuantificaron, se observaron al microscopio y se analizaron por PCR de acuerdo a lo descrito por Zarlenga y Dame, (1992).

Las larvas musculares recuperadas del diafragma de los caballos 84, 122 y 108 se enviaron a los Drs. Zarlenga y Lichtenfels (en el Laboratorio de Parasitología Biosistemática en Beltsville, Maryland, EUA) para su caracterización morfológica y por PCR (amplificación en cadena empleando la polimerasa). La obtención del DNA de las larvas obtenidas de las muestras y el PCR se realizó de acuerdo a lo descrito por Zarlenga y Dame, (1992). En este trabajo de colaboración las larvas se identificaron morfológicamente como *Trichinella*. En el PCR se obtuvo en las muestras 84 y 122 un producto de amplificación de 170 pb del mismo tamaño que el obtenido con DNA de *T. spiralis*, (Fig. 10 carril 2, 5 y 6) mientras que con el DNA de *T. nativa* y T5 se obtuvieron productos de amplificación de 130 pb (Fig. 10 carril 3 y 4). Con la muestra 108 no se obtuvo un producto de amplificación (Datos no mostrados). Considerando lo anterior y de acuerdo al tamaño de los productos de amplificación del DNA de las larvas musculares obtenidas de los caballos 84 y 122, éstas se clasificaron como *T. spiralis*.

Es importante mencionar que en el ELISA las muestras de sueros correspondientes a las muestras de diafragma con larvas musculares de *T. spiralis* (84, 106, 108 y 122) dieron valores de D.O. por debajo del punto de corte utilizando las tres preparaciones antigénicas y una dilución 1:400.

Por otro lado, el análisis de IET empleando los sueros 84, 106, 108 y 122 mostró el reconocimiento de varios componentes del parásito, entre ellos, las moléculas de 47, 52, 67, 72 y 105 kDa reconocidas por los sueros de caballos infectados experimentalmente (Fig. 11a). También en este ensayo se incluyeron sueros correspondientes a las muestras de diafragma que no tuvieron larvas por digestión artificial, no observándose reactividad hacia estos componentes (Fig. 11b).

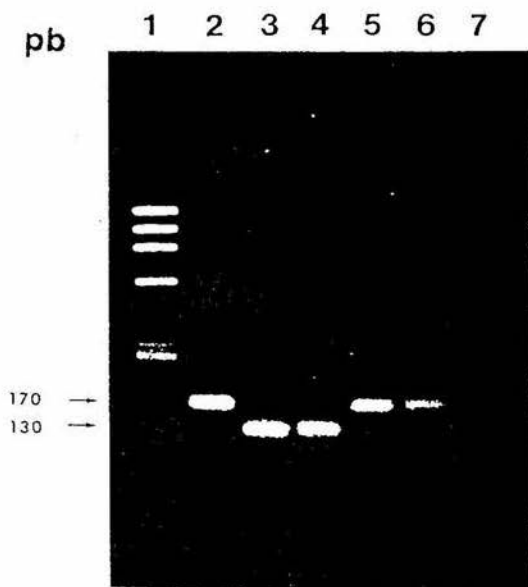


Fig. 10. Análisis electroforético de los productos amplificados del DNA de *Trichinella*, mediante PCR. La amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa se realizó por el Dr. Zarlenga usando los oligos oTsr1 y oTsr2 que comparten secuencias con el DNA ribosomal de la subunidad grande. Carril 1, DNA de \varnothing 174 digerido con Hae III; carril 2, DNA de *T. spiralis*; carril 3, DNA de *T. nativa*; carril 4, DNA de *Trichinella* tipo T5; carril 5 y carril 6 DNA de las larvas musculares obtenidas de diafragma de caballos de las muestras 84 y 122 respectivamente; carril 7, DNA de hígado de ratón. En el PCR se emplearon 0.25 μ g del DNA de las muestras control (carril 2, 3, 4, y 7). El peso molecular de los productos de PCR se indica a la izquierda en pares de bases (pb). Datos obtenidos en el trabajo de colaboración con los Dr. Zarlenga y Lichtenfels.



Fig. 11. Patrones de reconocimiento antigénico obtenidos por inmunoelectrotransferencia de los sueros de caballos de rastro positivos por digestión artificial. Los componentes del extracto total de *Trichinella spiralis* se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa (PNC). Los sueros de caballos de rastro se diluyeron 1:10 y se reaccionaron con las tiras de PNC; el conjugado conejo anti Ig Gs de caballo acoplado a peroxidasa se usó diluído 1:3,000. Panel a, carril 1, caballo No. 2 infectado experimentalmente con *T. spiralis*; carriles del 2 al 5, sueros correspondiente a los caballos con larvas musculares de *T. spiralis* en el diafragma. Panel b, carriles del 6 al 9, sueros de caballos negativos por digestión artificial. Los pesos moleculares usados como estandar se indican en kDa a la izquierda de la figura.

DISCUSION

La transmisión de la triquinelosis a humanos ha sido ocasionada más frecuentemente por el consumo de carne de cerdo infectada con el parásito (Cabral-Soto y cols., 1990; Contreras y Herrera, 1992; Hernández y cols., 1992; Martínez-Marañón, 1993,1985a,b; Salinas-Tobón y cols., 1994a,b,c). Sin embargo en años recientes se han reportado varios brotes de la enfermedad en humanos causados por la ingesta de carne de caballos (Ancelle y cols., 1985,1986,1988; Bourée y cols., 1988; Carneri y cols., 1988; Dick y cols., 1990; Mantovani, y cols., 1980). Esto último ha estimulado la realización de estudios sobre la detección del parásito en estos nuevos transmisores así como de la respuesta inmune inducida en ellos. En este contexto debe considerarse también que la carne de caballo por su accesibilidad en costo y por los gustos culinarios de los diversos individuos puede pasar a convertirse en un alimento que se integre a la dieta del mexicano. De hecho en México, el consumo de carne de caballo ha aumentado debido principalmente a que el precio de ésta es considerablemente más económico que la de res o puerco. Por otro lado, México es un país exportador de carne de caballo por lo que se requiere contar con métodos que permitan certificar la ausencia de infecciones por *T. spiralis* en estos animales. Considerando estos aspectos, en este trabajo inicialmente se establecieron las condiciones experimentales de infección de caballos con *T. spiralis* con el objetivo de analizar los parámetros inmunológicos que sentaran la base para estudios serológicos sobre incidencia de la enfermedad en rastros especializados en la matanza de caballos. Asimismo con la finalidad de validar datos inmunológicos con la detección del parásito se llevaron a cabo análisis de muestras de tejido muscular.

En estudios de tipo epidemiológico, para determinar frecuencia de infección por parásitos del género *Trichinella* es necesario considerar el curso de infección. Esto último nos permite determinar qué ensayos son útiles y optimizar éstos en cuanto a sensibilidad y especificidad. Así, en relación a el diagnóstico de triquinelosis equina empleando el ELISA, es importante tomar en cuenta lo que ha sido observado en este trabajo, en relación a la cinética de aparición de anticuerpos contra *T. spiralis* en caballos infectados experimentalmente con el parásito. En estos, se detectó la aparición de anticuerpos contra *T. spiralis*, a partir de la 3a semana p.i. alcanzando los niveles más altos entre la 5a y 10a semana p.i., para después disminuir hacia la semana 17 p.i. Al final del estudio la carga parasitaria en los 3 caballos tuvo un rango de 16 a 0.2 larvas/gr. Considerando esto, si el diagnóstico de la infección en equinos se realiza antes de la 3a semana p.i. ó después de la 17a semana p.i. es muy posible que los niveles de anticuerpos sean bajos y el animal sea un falso negativo. Por otro lado, estudios realizados por Soulé y cols., (1989) han demostrado que a partir de la semana

20 p.i. en caballos infectados experimentalmente con *T. nativa* comienza a disminuir el título de anticuerpos contra el parásito, correlacionándose con una carga parasitaria baja. Además, al realizarse una reinfección con la misma dosis inicial (20,000 larvas musculares de *T. spiralis*) el caballo elimina más rápidamente las larvas musculares y el nivel de anticuerpos contra el parásito decrece, existiendo también una correlación entre el número de larvas obtenidas de diafragma y macetero y el título de anticuerpos presentes en el suero de los caballos infectados.

Así, en este estudio se determinó la presencia de anticuerpos específicos contra *T. spiralis* en sueros de caballos de rastro, utilizando productos de E/S y antígenos de S/E, obteniéndose una positividad del 9.7 % y 3.6 % respectivamente. Estudios seroepidemiológicos de triquinosis equina en países europeos reportan una positividad del 1.6 al 6 % en caballos de rastro empleando extracto total de *T. spiralis* y productos de E/S respectivamente (van Knapen y cols., 1988; Virga y cols., 1994). Por los resultados observados tanto en este trabajo como en otros en los cuales se ha utilizado en ELISA los productos de E/S en el diagnóstico de la triquinosis equina, han demostrado que su uso confiere mayor sensibilidad al ensayo. Lo anterior también ha sido observado en el diagnóstico de triquinosis porcina (Arriaga y cols., 1989,1991; Gamble y cols., 1985b)

Sin embargo, resulta de interés mencionar que en este trabajo, las muestras de diafragma en las cuales se aislaron larvas de *T. spiralis* tuvieron una carga parasitaria baja (0.8 a 1.8 larvas/gramo) y en el ELISA las muestras de suero correspondientes tuvieron un nivel de anticuerpos bajo, considerándose como se mencionó anteriormente como negativos (falsos negativos) a la dilución empleada en el ensayo. Esto sugiere que como lo observado por Soulé y cols., (1989) hay una correlación entre carga parasitaria baja y niveles de anticuerpos. Sin embargo, para poder corroborar la relación entre el título de anticuerpos y la carga parasitaria hubiera sido importante tener muestras de diafragma de los animales de rastro que resultaron positivos en ELISA, ya que de estos caballos no se obtuvieron tejidos) los cuales tenían diferente título de anticuerpos contra *Trichinella*. Por lo que en un estudio posterior debería considerarse este aspecto. Otra forma de confirmar la infección por *Trichinella* sería la detección de antígeno circulante mediante un ensayo inmunoenzimático semejante al utilizado en cerdo (Arriaga y cols., 1995), con lo cual se tendría la certeza de la presencia del parásito.

Además de los métodos directos y serológicos: la técnica de PCR puede ser usada en el diagnóstico molecular de triquinosis equina empleando las sondas previamente caracterizadas (Dupouy-Camet y cols., 1988; Dick y cols., 1990; Zarlenga y Dame, 1992).

Cabe mencionar que por ELISA los sueros correspondientes a las muestras de diafragma en las cuales se detectaron larvas musculares de *T. spiralis*, a la dilución empleada, resultaron negativas, posiblemente fuera necesario emplear diluciones más bajas. Sin embargo, estos sueros al igual que las muestras positivas por ELISA empleando los productos de E/S presentaron por IET un patrón de reconocimiento característico de animales infectados con *T. spiralis* (Fig. 7 y 9) (Arriaga y cols., 1989). Lo anterior sugiere que tanto IET como ELISA son útiles en el diagnóstico de triquinelosis equina, aunque la IET es mucho más sensible como ha sido demostrada en triquinelosis porcina (Arriaga y cols., 1989; Su y cols., 1991).

El hecho de haber encontrado 4 caballos con larvas en este estudio (5%) y a diferencia de lo encontrado en Europa, en donde se han examinado miles de muestras sin haberse detectado larvas de *Trichinella*, pudiera explicarse en parte a que se digirió de 22 a 37 gr de muestra de diafragma, a diferencia de lo realizado en países europeos, donde se digieren 10 gr de carne, lo cual posiblemente aumentó la sensibilidad del método. A este respecto como se mencionó con anterioridad existe la evidencia de haberse detectado únicamente, una larva de *Trichinella* en el *biceps brachialis* de un caballo proveniente de Polonia mediante la digestión de 38 gr de carne (Boni y cols., 1989), lo cual no hubiera sido posible si la cantidad de carne hubiera sido menor. Debe señalarse que las 4 muestras positivas se obtuvieron el mismo día, de un mismo lote de caballos lo que sugiere que la infección por *Trichinella* está muy localizada.

En México, no se conoce la frecuencia de la triquinelosis en caballos, ya que actualmente, el diagnóstico de triquinelosis equina por digestión artificial se realiza únicamente en los rastros Tipos Inspección Federal (TIF), a partir de los cuales se exportan los canales a países europeos. Por los resultados obtenidos en este estudio es evidente que esta parasitosis es más frecuente en caballos de lo que pudiera esperarse de un animal herbívoro por lo que se requiere se lleve a cabo el diagnóstico de triquinelosis equina en todos los rastros de caballo de la República Mexicana, lo cual permitiría además, obtener información acerca de la prevalencia real de la triquinelosis equina en México.

En este método de diagnóstico directo se acostumbra digerir de 1 a 10 gr de carne, sin embargo, como se mencionó anteriormente la sensibilidad del método es de 3 larvas/gramo de muestra, por lo que sería recomendable aumentar la cantidad de carne analizada. En los otros rastros de caballos, un porcentaje alto de esta carne se destina para consumo humano y no se le realiza ningún tipo de inspección para *Trichinella*.

Por otro lado, a pesar de que existen estudios que demuestran que los caballos se pueden infectar experimentalmente con varias especies de *Trichinella* (*T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. spiralis*), y que *T. spiralis* es la especie con mayor adaptación (Polidori y cols., 1988; Soulé y cols., 1989, 1993a). Sin embargo, la forma en que un animal herbívoro como el caballo se infecta con *Trichinella* no está clara. Sin embargo se ha propuesto que la fuente de transmisión de la infección sea el alimento contaminado con carne de animales infectados (Bourée y cols., 1988; Dupouy-Camet y cols., 1994; van Knapen y cols., 1988). Asimismo, existen reportes que indican que en otros animales herbívoros (borrego y vacas) además del caballo se ha demostrado infección por *Trichinella* (Murrel y cols., 1994). De esto se desprende la necesidad de realizar estudios acerca de la ruta de infección, así como de la transmisión de la infección a humanos por animales herbívoros, que paralelamente con el empleo de métodos de diagnóstico adecuados favorecerá el control de la transmisión de la triquinelosis a humanos mediante el consumo de carne de caballo infectada con *Trichinella*.

CONCLUSIONES

- 1.- La respuesta de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en sueros de caballos infectados experimentalmente con el parásito se detecta a partir de la 3a semana p.i. y los niveles más altos se observan entre la 5a a 10a semana p.i. y posteriormente decrecen alrededor de la semana 17 p.i.
- 2.- Al utilizar productos de excreción/secreción (E/S) y antígenos de superficie/esticosoma (S/E) en ensayos de ELISA con sueros de caballos del rastro 5 de Junio de San Vicente Chicolopan se encontró una positividad del 9.7 % y 3.6 % respectivamente. El empleo de los productos de E/S aumentó la sensibilidad del ELISA.
- 3.- El análisis por inmunoelectrotransferencia (IET) evidenció el reconocimiento de los antígenos de S/E (conformados en el grupo TsL1) con peso molecular de 47, 52, 59, 67, 72 y 105 kDa de la larva muscular de *T. spiralis* por sueros de caballos infectados natural y experimentalmente con el parásito.
- 4.- En 4 muestras de diafragma de caballos de rastro se detectó la presencia de larvas de *Trichinella spiralis*.
- 5.- Las muestras de suero correspondientes a las muestras de diafragma de caballos de rastro a partir de los cuales se aislaron las larvas musculares de *T. spiralis* resultaron negativos por ELISA en las condiciones empleadas en este ensayo. Sin embargo, por IET esencialmente se reconocieron los mismos componentes de S/E de la larva muscular de *T. spiralis* que fueron reconocidos por caballos infectados experimentalmente.
- 6.- El método de ELISA e IET son útiles en el diagnóstico de la triquinelosis equina.

APENDICE A

AMORTIGUADORES

Amortiguador de fosfatos salino (PBS)

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

Amortiguador de carbonatos pH 9.6

Carbonato de sodio 1.59 gr y Bicarbonato de sodio 2.93 gr aforar a 1 lt.

Amortiguador de citrato-fosfato pH 5

24.3 ml de Ac. Cítrico 0.1 M más 25.7 ml de Fosfato de sodio 0.2 M ajustar el pH a 5.0 y aforar a 100 ml.

Amortiguador de corrida

3.02 gr de Trisma base, 14.41 ml de glicina, 5 ml de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20 %, ajustar el pH a 8.3 y aforar a 1 lt.

Amortiguador de transferencia

12.11 gr de Trisma base, 57.68 gr de glicina, 800 ml de metanol y aforar a 4 lt.

Solución de incubación para las tiras de nitrocelulosa

Stock (10x)

4 gr de ASB, 4 ml de Tritón x-100 10 %, 2 ml de SDS al 20 % y aforar a 10 ml.

APENDICE B

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

Para la elaboración de los geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se prepararon las siguientes soluciones.

AMORTIGUADOR PARA EL GEL CONCENTRADOR (BGC 8X)

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

AMORTIGUADOR PARA EL GEL ESPACIADOR (BGE 5X)

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

ACRILAMIDA 30 % / BISACRILAMIDA 0.8 %.

60 gr de acrilamida, 1.6 gr de N' N'-metilen-bis acrilamida, 60 ml de Glicerol, aforar a 200 ml y posteriormente filtrar varias veces.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA

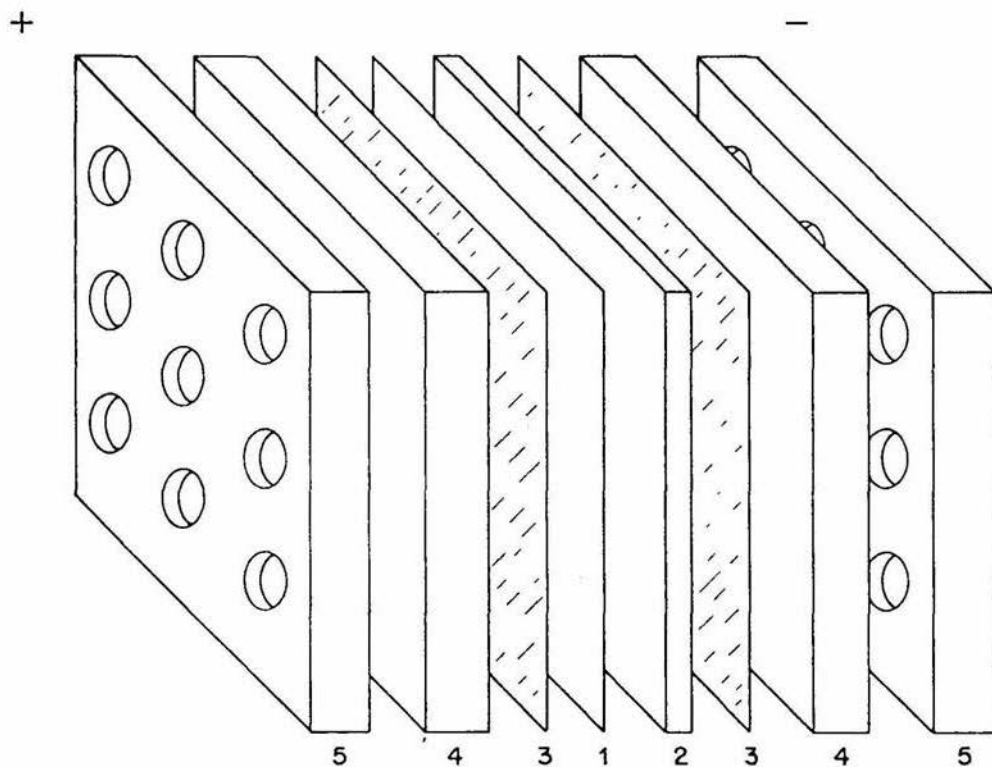
Trisma base 2M pH 6.8 (0.78 ml), SDS al 20 % (2.5 ml), glicerol (0.97ml), β -mercaptoetanol (1.25 ml), Pironina al 2 % en glicerol al 60 % (25 μ l), aforar a 5 ml.

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

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

	ESPACIADOR (10 %)	CONCENTRADOR (5 %)
BGC (8X)	2.5 ml	---
BGE (5x)	---	3.76 ml
H ₂ O	8.8 ml	14.16 ml
Acril-bisacrilamida 30:0.8 %	6.32 ml	3.32 ml
N' N' N' N' - Tetrametiletilenediamina (TEMED)	12 μ l	12 μ l
Persulfato de amonio (APS) 10 %	44 μ l	110 μ l

APENDICE C



La transferencia de proteínas del extracto total de *Trichinella spiralis* separadas por SDS-PAGE empleando geles de poliacrilamida al 10 % se llevó a cabo empleando el dispositivo que se muestra: 1) Papel de nitrocelulosa; 2) gel de poliacrilamida al 10 %; 3) papel Whatman 3MM; 4) fibras Scotch Brite; 5) soportes de plexiglass. Los signos negativo y positivo corresponden al cátodo y ánodo respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Heyer, F., Faurant, C. and Lapierre, J. (1985). Outbreak of trichinosis due to horse meat in the Paris area. *Lancet*, 8456: 660.
- Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Heyer, F., Faurant, C., Lapierre, J., Parham, G., Leese, W. and Leigty, J. C. (1986). Horsemeat associated trichinosis-France. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 35: 291-298.
- Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Bournoux, M. E., Fourestie, V., Petit, H., Mougeot, G., Nozais, J. P. and Lapierre, J. (1988). Two outbreaks of trichinosis caused by horsemeat in France in 1985. *American Journal of Epidemiology*, 127: 1302-1311.
- Appleton, J. A., Bell, R. G., Homan, W. and van Knapen, F. (1991). Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*, 7(8): 190-192.
- Arriaga, C., Muñiz, E., Morilla, A. and Ortega-Pierres, G. (1989). *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Experimental Parasitology*, 69: 363-372.
- Arriaga, C., Salinas-Tobón, R., Morilla, A. and Ortega-Pierres, G. (1991). Use of purified surface/stichosomal antigens of *Trichinella spiralis* muscle larva in the detection of naturally infected swine. *Research and Reviews in Parasitology*, 51(1-4): 103-105.
- Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., Morilla, A. and Ortega-Pierres, G. (1995). Detection of circulating *Trichinella spiralis* muscle larva antigens in serum samples of experimentally and naturally infected swine. *Veterinary Parasitology*, 58: 319-326.
- Battelli, G., Guberti, V. and Martini, M. (1994). Trichinellosis control in Italy: Considerations on sampling in imported horses and their meat. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, C. W., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 593-598.
- Boni, P., Zanardi, G. and Lodetti, E. (1989). Rinvenimento di larve di *Trichinella* in carne di cavallo. *Selezione Veterinaria*, 30: 1179-1183.
- Bourée, P., Leymarié, J. L. and Aubé, C. (1988). Epidemiological study of two outbreaks of trichinosis in France, due to horse meat. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 382- 386.
- Cabral-Soto, J., Villicaña-Fuentes, H., Fragozo-Urbe, R. y Contreras, A. (1990). Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. *Salud Pública de México*, 32(5): 575-582.

- Carneri de, I., Ancelle, T., Dupouy-Camet, J. and Pozio, E. (1988). Different aetiological agents cause the european outbreaks of horsemeat induced human trichinellosis. In: Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 387-391.
- Contreras, A. A. J. y Herrera, E. R. (1992). Triquinosis porcina en el estado de Zacatecas. *Revista Mexicana de Parasitología*, 3(1): 25-27.
- Correa, P., Arias-Stello, J., Pérez, T. R. y Carbonell, L. C. (1980). Texto de patología, Segunda edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana, Copilco-Universidad. México, D.F. Pág. 248-250 y 1120.
- Dennis, D. T., Despommier, D. D. and Davis, N. (1970). Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *Journal of Parasitology*, 56(5): 974-977.
- Denkers, E. Y., Wassom, D. L., Krco, C. J. and Hayes, C. E. (1990). The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *Journal of Immunology*, 144(8): 3152-3159.
- Denkers, E. Y., Hayes, C. E. and Wassom, D. L. (1991). *Trichinella spiralis*: Influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. *Experimental Parasitology*, 72(4): 403-410.
- Dick, T. A., DeVos, T. and Dupouy-Camet, J. (1990). Identification of two isolates of *Trichinella* recovered from humans in France. *Journal of Parasitology*, 76(1): 41-44.
- Dupouy-Camet, J., Soulé, C. and Ancelle, T. (1994). Recent news on trichinellosis: Another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite*, 1: 99-103.
- Fetzner, R., Nash, C. W., Miller, C. J. and Russell, L. (1991). A report on the April 8-18, 1991 visit of a United States Department of Agriculture (USDA) team to France regarding the outbreak of trichinosis in humans. In: Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 95: 162-170.
- Gamble, H. R., Anderson, C. E., Graham, A. R. and Murrell, K. D. (1983). Diagnosis swine of trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Veterinary Parasitology*, 13: 349-361.
- Gamble, H. R. (1985a). *Trichinella spiralis*: Immunization of mice using monoclonal antibody affinity-isolated antigens. *Experimental Parasitology*, 59(1): 398-404.
- Gamble, H. R. (1985b). Comparison of immune effects in mice immunized with *Trichinella spiralis* adult and larval antigens. *Journal of Parasitology*, 71(5): 680-682.
- Hernández, M., Ramos-Martínez, E., Casco-Sánchez, E. J., Morales-Gómez, J. M. y Pérez-Matos, E. M. (1992). Triquinosis aguda. Epidemia de 166 casos en Ciudad Delicias, Chihuahua. Diagnóstico por compresión tisular y tinción. *Gaceta Médica de México*, 128(1): 45-50.

- International Committee Office International des Epizooties (1992). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Second Edition. Ed. Standards Commission and approved by the International Committee of the O.I.E. Pág. 543-547.
- Kozek, W. J. (1975). *Trichinella spiralis*: Morphological characteristics of male and female intestine-infecting larvae. *Experimental Parasitology*, 37: 380-387.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mantovani, A., Filippini, I., and Berghomi, S. (1980). Indagini su' un'epidemia di trichinellosi umana verificatasi in Italia. *Parasitology*, 22: 107- 134.
- Martínez-Marañón R. (1983). Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. *Salud Pública de México*, 25(6): 574-578.
- Martínez-Marañón, R. (1985a). ¿Está aumentando la triquinosis en México? ¿Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo" ? *Salud Pública de México*, 27(1): 40-51.
- Martínez-Marañón, R., Escobar-Luján, M., Bañuelos-Robles, M. y Díaz-Castorena, G. (1985b). Otro brote de triquinosis en la ciudad de Zacatecas y observaciones sobre la eosinofilia de esta enfermedad. *Salud Pública de México*, 27(2): 174-179.
- Murrell, K. D. (1985a). Strategies for the control of human trichinosis transmitted by pork. *Food Technology*, 39(3): 65-68 y 110-111.
- Murrell, K. D. (1985b). *Trichinella spiralis*: Acquired immunity in swine. *Experimental Parasitology*, 59(3): 347-354.
- Murrell, K. D., Anderson, W. R. and Schad, G. A., Hanbury, R.D., Kazacos, K. R. Gamble H. R. and Brows, J. (1986). Field evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay for swine trichinosis: Efficacy of the excretory-secretory antigen. *American Journal of Research*, 47(5): 1046-1049.
- Murrell, K. D., (1994). Beef as source of trichinellosis. *Parasitology Today*, 10: 434.
- Neugebauer, J. (1983). Atlas de enfermedades infecciosas. Ed. Roche. Suiza. Pág 110.
- Ortega-Pierres, G., Muñiz, E., Coral-Vázquez, R. and Parkhouse, R. M. E. (1989). Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitology Research*, 75(7): 563-567.

- Parkhouse, R. M. E., Philipp, M. and Ogilvie, B. M. (1981). Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunology*, 3(4): 339-352.
- Parkhouse, R. M. E. (1984). Immunopurification. *British Medical Bulletin*, 40(3): 297-301.
- Padilla, L. E., De la Rosa, A. J. L., Miramón, P. G., Correa, B. D. y Aranda, J. (1994). Prevalencia de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en Cerritos, S.L.P. *Memorias del XI Congreso Nacional de Parasitología*. Querétaro, Qro.
- Polidori, G. A., Gramenzi, F., Fioretti, D. P., Ferri, N., Ranucci, S., Moretti, A., Scacchia, M., Bellelli, C. and Baldelli, B. (1988). Experimental trichinellosis in horses. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 268-274.
- Pozio, E., Varese, P., Gómez-Morales, M. A., Croppo, G. P., Pelliccia, D. and Bruschi, F. (1993). Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(4): 568-575.
- Ramisz, A. (1985). Current problems of epidemiology and epizootiology of trichinellosis. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Sixth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Kim, Ch. W. Ed. The State University of New York Press Albany, New York, USA. Pág. 190-200.
- Ramisz, A. (1988). Studies on some epizootiological and epidemiological problems of trichinellosis in Poland. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 370-375.
- Ramisz, A. and Balicka, A. (1994). Remarks on horse trichinellosis in Poland. *Wiadomości Parazytologiczne*, 40(4): 381-399.
- Robinson, M., Krco, C. J., Beito, T. G. and David, C. S. (1991). Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. *Parasite Immunology*, 13(4): 391-404.
- Ruitenbergh, E. J., van Knapen, F. and Elgersma, A. (1983). Incidence and control of *Trichinella spiralis* throughout the world. *Food Technology*, 37: 98.
- Salinas-Tobón, M. R., Martínez-Marañón, R., Velasco-Castrejón, O. and Chapa-Ruiz, M. R. (1994a). Serological analysis of human trichinellosis cases occurred in Mexico during the period of 1984-1990 by standardized ELISA assay. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, W. C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 491-496.
- Salinas-Tobón, M. R., Chapa-Ruiz, M. R. and Ortega-Pierres, M. G. (1994b). Evaluation of *Trichinella spiralis* surface antigens from muscle larva, adult and newborn larva for the

- diagnosis of human trichinellosis. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, W. C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 365-371.
- Salinas-Tobón, M. R., Valdez-Cruz, C., Chapa-Ruiz, M. R. and Ortega-Pierres, M. G. (1994c). Longitudinal analysis of the human response to *Trichinella spiralis* antigens by ELISA and Western Blot assays. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, W. C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 373-379.
- Soulé, C., Dupouy-Camet, J., Ancelle, T., Gillet, J. P. and Collobert, C. (1988). *Trichinella spiralis* larvae in muscles of experimentally infected horses in relation to the antibody response. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 275-280.
- Soulé, C., Dupouy-Camet, J., Georges, P., Ancelle, T., Gillet, J. P., Vaissaire, J., Delvigne, A. and Plateau, E. (1989). Experimental trichinellosis in horses: biological and parasitological evaluation. *Veterinary Parasitology*, 31:19-36.
- Soulé, C., Dupouy-Camet, J., Georges, P., Fontaine, J. J., Ancelle, T., Delvigne, A., Perret, C. and Collobert, C. (1993a). Variations biologiques et parasitaires chez des chevaux infestés et réinfestés par *Trichinella spiralis*. *Veterinary Recherche*, 24: 21-31.
- Soulé, C., Candolfi, E., Dupouy-Camet, J., Perret, C. and Collobert, C. (1993b). *Trichinella spiralis* circulating antigens and antibodies in experimentally infected horses. In: *Trichinellosis: Abstract of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Orvieto, Italy, Pág 141.
- Su, X. and Prestwood, K. A. (1991). A dot-ELISA mimicry Western blot test for the detection of swine trichinellosis. *Journal of Parasitology*, 77(1): 76-82.
- Stewart, G. (1983). Pathophysiology of the muscle phase. In: "Trichinella and trichinosis". Ed. W. C. Campbell. Plenum New York/London. Pág 241-264.
- Touratier L. (1991). Prévention et surveillance de la trichinellose. In: Soulé, C., et Dupouy-Camet, J. Ed. "La trichinellose, une zoonose en évolution", CNEVA-OIE Ed. Paris, Francia. Pág. 211-270.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy in Science USA*, 76(9): 4350- 4354.
- van Knapen, F. and Franchimont, J. H. (1988). *Trichinella spiralis* infection in horses. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A. R. and Bolas-Fernández, F. Ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain. Pág. 376-381.

- van Knapen, F., Franchimont, J. H., Ruitenbergh, E. J., André, P., Baldelli, B., Gibson, T. E., Gottal, C., Henriksen, S. A., Köhler, G., Ronéus, O., Skovgaard, N., Soulé, C., Strickland, K. L. and Taylor, S. M. (1981). Comparison of four methods for early detection of experimental *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology*, 9: 117-123.
- van Knapen, F., Franchimont, J. H., Ruitenbergh, E. J., André, P., Baldelli, B., Gibson, T. E., Henriksen, S. A., Köhler, G., Ronéus, O., Skovgaard, N., Soulé, C., Strickland, K. L., Taylor, S. M., Thomsen, D. U. and Wolff, F. (1984). Comparison of three methods for detection of prolonged experimental Trichinellosis in pigs. *Veterinary Parasitology*, 16: 167-171.
- Virga, A., Gomez-Morales, M. A., Croppo, G. P. and Pozio, E. (1994). Specificity of ELISA test in the diagnosis of equine trichinellosis. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, W. C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 387-390.
- Wassom, D. L., Wisnewski, N., McNeil, M. and Grieve, R. B. (1994). Immunodiagnosis of *Trichinella* infection: use of unique carbohydrate epitopes as target antigens. In: *Trichinellosis: Proceedings of the Eighth International Conference on Trichinellosis*. Edited by Campbell, W. C., Pozio, E. and Bruschi, F. Ed. Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy. Pág. 295-298.
- Wisnewski, N., McNeil, M., Grieve, R. B. and Wassom, D. L. (1993). Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(1): 25-36.
- Zarlenga, D. S. and Dame, J. B. (1992). The identification and characterization of a break within the large subunit ribosomal RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 281-290.

