

00346
/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"APLICACION DE LA TECNICA DE LA REACCION EN
CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNOSTICO
DE LA TRIQUINELOSIS MURINA EN LA FASE TEMPRANA
DE INFECCION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A:

BIOL. MARIA DE LOURDES CABALLERO GARCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ENEDINA JIMENEZ CARDOSO

MEXICO. D. F.

JULIO, 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 FUE DIRIGIDO POR LA DRA. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO "FEDERICO GÓMEZ. LA BIÓLOGA MARIA DE LOURDES CABALLERO GARCÍA AGRADECE LA BECA OTORGADA POR EL CONACYT CON NUMERO 117239.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA:

A mi madre:

**Por todo su amor, tan grande
como su alma.**

A mi esposo:

**Por todo su apoyo, sus consejos,
su paciencia y su alegría .**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Enedina Jiménez Cardoso por la orientación y asesoría brindados durante la realización del presente trabajo.

Al comité de sinodales formado por: Dra Lilián Yopez Mulia, M. En IIB. Felipe Mendoza Pérez, Dra Edda Lidia Sciutto Conde, Dra Patricia Margarita Tato Zaldivar, Dr. Alejandro Cruz Reyes y al Dr. Abraham Landa Piedra, por la revisión y atinadas observaciones realizadas en el presente trabajo.

A la Dra. Guadalupe Ortega Pierres, por la asesoría en el manejo de los parásitos utilizados en el presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo cotidiano.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

*Un científico tiene la libertad, y debe tomársela,
de plantear cualquier cuestión, de dudar
de cualquier afirmación,
de buscar cualquier evidencia,
y de corregir errores.
J. Robert Oppenheimer.*

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
1. INTRODUCCION	4
1.1. El parásito	4
1.1.a. Biología de <i>Trichinella spiralis</i>	4
1.1.b. Historia	5
1.1.c. Posición taxonómica	6
1.1.d. Patrones de transmisión	6
1.1.e. Variación intraespecífica	7
1.1.f. Morfología	10
1.1.g. Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	13
1.1.g. Mecanismos de patogenicidad	14
1.2. Triquinelosis	16
1.2.a. Epidemiología de <i>T. spiralis</i>	16
1.2.a.I. Distribución geográfica mundial	16
1.2.a.II. Distribución en México	17
1.2.b. Mecanismos de patogenicidad	20
1.2.c. Tratamiento	23
1.c.I. Tratamientos sintomático	24
1.c.II. Terapia específica	24
1.2.d. Prevención y control	26
1.3. Métodos de diagnóstico	27
1.3.a. Métodos parasitológicos (Métodos directos)	27
1.3.b. Métodos clínicos	29
1.3.c. Pruebas serológicos	30
1.3.d. Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	35
2. JUSTIFICACIÓN	40
3. HIPÓTESIS	41
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAL Y METODOS	43
5.1. Parásitos	43
5.2. Animales de experimentación	43
5.3. Mantenimiento del ciclo de vida y obtención del parásito a partir de músculo de rata infectada con <i>T. spiralis</i>	43
5.4. Infección y colecta de sangre	44
5.5. Obtención del estadio adultos de <i>T. spiralis</i> para verificar que los animales estuvieran infectados en la fase temprana de infección	44
5.6. Extracción de DNA de sangre de los lotes control y experimental de ratones infectados con <i>T. spiralis</i>	45
5.7. Amplificación de DNA por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	45
5.8. Southern blot	46
5.9. Hibridación	46
6. RESULTADOS	48
6.1. Infección	48
6.1.1. Determinación del inóculo adecuado para la infección en ratones BALB/c con <i>T. spiralis</i>	48
6.1.2. Obtención de formas adultas de <i>T. spiralis</i>	49
6.1.3. Obtención de larvas a partir de músculo de rata y ratones infectados con <i>T. spiralis</i> .	50

6.2. Extracción de ADN de sangre de ratones no infectados e infectados con <i>T. spiralis</i> .	53
6.3. Análisis de productos de PCR obtenidos con diferentes concentraciones de DNA de larvas de <i>T. spiralis</i> .	54
6.4. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con diferente concentración de DNA de larvas de <i>T. spiralis</i> .	54
6.5. Análisis de productos de PCR obtenidos con diferente número de larvas de <i>T. spiralis</i> .	56
6.6. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con diferente número de larvas de <i>T. spiralis</i> .	56
6.7. Análisis de productos de PCR obtenidos con DNA genómico de sangre de ratones no infectados e infectados con <i>T. spiralis</i> .	58
6.8. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con DNA de sangre de ratones infectados y no infectados con <i>T. spiralis</i> .	58
7. DISCUSION.	61
8. CONCLUSIONES.	70
9. BIBLIOGRAFIA.	71
APENDICES.	
APENDICE 1. AISLAMIENTO DE DNA DE CÉLULAS.	84
APENDICE 2. ELECTROFORESIS.	86
APENDICE 3. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA.	87
APENDICE 4. TRANSFERENCIA DE DNA DE GELES DE AGOROSA A MEMBRANAS (Southern blot).	88
APENCICE 5. HIBRIDACIÓN CON SONDA MARCADA CON FLUORESCEINA	90

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

- Fig.1. Tipos de ciclos de *Trichinella* spp en animales.
- Fig.2. Presentación esquemática de las diferentes fases de *Trichinella spiralis*.
- Fig.3. Presentación esquemática de un complejo intacto célula nodriza –parásito.
- Fig.4. Ciclo de vida de *T. spiralis*.
- Fig.5. Distribución geográfica mundial de triquinelosis.
- Fig.6. Distribución en México de brotes de triquinelosis animal y humana.
- Fig.7. Determinación del inoculo adecuado para la infección de ratones BALB/c con *T. spiralis*.
- Fig.8. Observación microscópica de adultos de *T. spiralis* obtenidos a partir de ratones BALB/c infectados experimentalmente con el parásito.
- Fig.9. Observación microscópica de larvas de *T. spiralis* en músculo de ratones BALB/c infectados experimentalmente con el parásito.
- Fig.10. Análisis electroforético, en geles de agarosa al 1% de DNA extraído de sangre de ratones infectados con *T. spiralis* asi como de animales no infectados.
- Fig.11. Productos de amplificación obtenidos de diferentes concentraciones de DNA de larva LM de *T. spiralis* analizados en geles de agarosa al 1.5%.
- Fig.12. Productos de amplificación obtenidos de DNA de diferente número de larvas (LM) de *T. spiralis* analizados con geles de agarosa al 1.5%
- Fig.13. Productos de amplificación obtenidos de DNA de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis* en los días 0-12 post-infección y analizados en geles de agarosa al 1.5%.
- Fig.14. Productos de amplificación obtenidos de DNA de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis* en los días 15-35 post-infección y analizados con geles de agarosa al 1.5%.

Tablas

- Tabla 1. Criterios para la caracterización de aislados de *Trichinella* spp.
- Tabla 2. Resumen de las principales características de las siete especies del género *Trichinella*.
- Tabla 3. Casos y brotes de triquinelosis en México.
- Tabla 4. Cuadro sinóptico de las fases biológicas progresivas del desarrollo de *T. spiralis* y los correspondientes cuadros clínicos .

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Acido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
kb	Kilobases
LM	Larva Muscular
LRN	Larva Recién Nacida
ng	nanogramos
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino
pb	Parés de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	picogramos
RNA	Acido Ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Cloruro de sodio-Citrato de sodio
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris Ácido Acético EDTA
Taq polimerasa	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>

RESUMEN

Trichinella spiralis es un nemátodo parásito agente causal de la triquinosis o triquinosis, una enfermedad que afecta a humanos y muchos otros mamíferos, en particular, en México, esta enfermedad no tiene una forma de diagnóstico en la fase temprana de infección, porque el diagnóstico definitivo de la triquinosis se realiza solo por la demostración de larvas enquistadas en el músculo. Sin embargo, los métodos parasitológicos, clínicos y serológicos que se utilizan no son muy sensibles y el parásito no puede detectarse en infecciones con una carga parasitaria baja. Actualmente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha aplicado para la identificación de DNA de la larva muscular de *T. spiralis* lo que representa una posibilidad de su uso en el diagnóstico en la fase temprana de la infección. El objetivo de este trabajo fue detectar por PCR la presencia del parásito en sangre la fase temprana de infección en ratones experimentalmente infectados con *T. spiralis* usando los iniciadores pPRA. Para lograr esto, treinta y tres ratones hembras BALB /c de 4-6 semanas se infectaron por vía oral con 300 larvas de *T. spiralis* por ratón. Se incluyó como control negativo otro lote de animales con las mismas características y número que el grupo experimental. Las muestras de sangre se colectaron en ambos grupos a los días: 0,3,5,7,10,12,15,17,20,22,30 y 35 post-infección en presencia de EDTA. Se realizó la extracción de DNA de las muestras de sangre obtenidas por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La concentración de DNA se determinó por absorbancia de luz ultravioleta a 260 nm y se usaron 500 ng de DNA para la PCR. Para determinar la susceptibilidad de la PCR se obtuvo DNA desde una hasta 200 larvas equivalente a 90 pg y 500 ng respectivamente. Se realizó la técnica de hibridación usando una sonda marcada con fluoresceína y revelada por quimioluminiscencia.

Con el uso de la técnica de PCR, pudo detectarse DNA desde 200 larvas hasta una larva y la concentración de DNA mínima con la que se obtuvo la amplificación específica de 2 productos de 600 y 800 pb fue de 0.2 ng. Se detectó por la PCR, DNA de larvas recién nacidas en el torrente sanguíneo en el día 5 post-infección y por hibridación en el día 3 post-infección con los mismos productos amplificados por el PCR. En el grupo control no hubo amplificación.

La técnica de PCR pudo detectar la presencia de DNA en la fase temprana de la infección (día 5-17) lo cual permite hacer un diagnóstico temprano y específico a partir de una larva y/o a concentraciones bajas de material genético.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última parte del siglo XIX y principios del XX, la triquinelosis o también conocida como triquinosis, fue una enfermedad importante como problema de salud pública. Se menciona que desde años antes esta parasitosis fue objeto de especial interés por las autoridades de sanidad, médicos y parasitólogos, particularmente en Estados Unidos de América, en donde hubo epidemias y hasta defunciones en grupos de personas que habían ingerido carne de cerdo infectada con el agente causal¹. Actualmente se sabe que esta enfermedad es causada por el nemátodo *Trichinella spiralis* (Owen, 1835), Railliet, 1895 tiene una amplia distribución en todo el mundo y que con excepción de Puerto Rico, Australia y Dinamarca infecta a una gran variedad de mamíferos incluido el humano, por lo que constituye un problema de salud en medicina humana y veterinaria.²

1.1. El parásito

1.1.a. Biología de *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis es un nemátodo parásito perteneciente a la familia Trichinellidae, el cual posee un inusual ciclo de vida que le permite a un mismo hospedero funcionar como definitivo e intermediario y desarrollar en éste los estadios de larva y adulto, que se localizan en los diferentes órganos del hospedero. Posee además la capacidad de formar una célula nodriza en el tejido muscular de su hospedero que le permite vivir de forma intracelular y sobrevivir por mucho tiempo³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.1.b. Historia

El primer descubrimiento de la larva de *T. spiralis*, se realizó en Londres en 1828 por Peacock a través de la revisión de músculos en autopsias de cadáveres. James Piaget en 1835 junto con Richard Owen observaron la presencia del gusano en una pieza de diafragma humano, pero fue Owen el primer investigador que realizó la descripción morfológica del nemátodo a la Sociedad Zoológica de Londres y lo llamó "*Trichina spiralis*", sin embargo, este nombre genérico se hallaba ocupado por el de un díptero que nombró Meigen en 1839 por lo que perdió validez por Ley de Prioridad de la Nomenclatura Zoológica. Años mas tarde, Railliet en 1895 propone el nombre de *Trichinella* (de trix, tricós, cabello) *spiralis* (del latín en espiral), que se adoptó por la comunidad científica y le dio nombre definitivo al parásito.^{4,5}

Posteriormente Von Siebold en 1844 y Dujardín en 1845, aportaron pruebas para confirmar que el parásito era el estadio larvario de un nemátodo. Joseph Leidy encontró la misma fase larvaria del parásito en carne de cerdo (1846) e hizo notar su semejanza con el que previamente se reportó en el humano. Por 1860, Virchow y Leuckart demostraron que lo que entonces se conocía como "quistes del parásito" se convertían en gusanos adultos, pocos días después de que se administraron en animales de experimentación y que las hembras depositaban larvas vivas en la pared del duodeno que migraban a los músculos para enquistarse en ellos. Con este descubrimiento se dieron a conocer las principales formas del ciclo de vida de *T. spiralis*. En 1860, Friedrich van Zenker, describió el primer caso fatal por causa de esta parasitosis, en una campesina de 20 años de edad, que había muerto de "fiebre tifoidea atípica", en esta joven se describieron formas intestinales de *Trichinella spiralis*. En este estudio se encontraron miles de larvas enquistadas en los músculos del cadáver y concluyó que la

infección fue el resultado de la ingesta de salchichas crudas, además subrayó la importancia clínica de la triquinelosis. Transcurrieron muchos años antes de que investigadores alemanes comprobaran experimentalmente que el consumo de carne de cerdo infectada, cruda o mal cocida era la principal vía de infección con *T. spiralis*.^{1, 6, 7} Durante la última parte del siglo XIX y principios del XX esta parasitosis se reconoció como un problema importante de salud pública. Actualmente, los estudios en relación con este problema siguen dando a conocer nuevos avances y perspectivas que permiten el mejor conocimiento de *T. spiralis* y la enfermedad que produce.

1.1.c. Posición taxonómica^{6,8}

Phylum:	Nematoda	(Rudolphi, 1808)
Clase:	Adenophorea()	Chitwood, 1958
Orden:	Enoplida	Shurmans, Stekhoven y Deconick, 1933
Superfamilia:	Trichuroidea	Railliet, 1916
Familia:	Trichinellidae	Ward, 1907
Género:	<i>Trichinella</i>	Railliet, 1895
Especie:	<i>Trichinella spiralis</i>	(Owen, 1835) Railliet, 1895

1.1.d. Patrones de transmisión

T. spiralis es un parásito con una amplia distribución geográfica que involucra numerosos mamíferos tanto carnívoros como carroñeros y recientemente se describió también en herbívoros particularmente en caballos.^{9,10,11} Para poder clasificar el tipo de infección en animales el término de triquinelosis silvestre se aplica para describir el ciclo de infección entre carnívoros y su presa o carroña, mientras que la triquinelosis doméstica se aplica al ciclo de infección entre humanos, ratas y cerdos (**Fig. 1**)¹. Hay un consenso general que indica que el cerdo doméstico y la rata sinantrópica representan

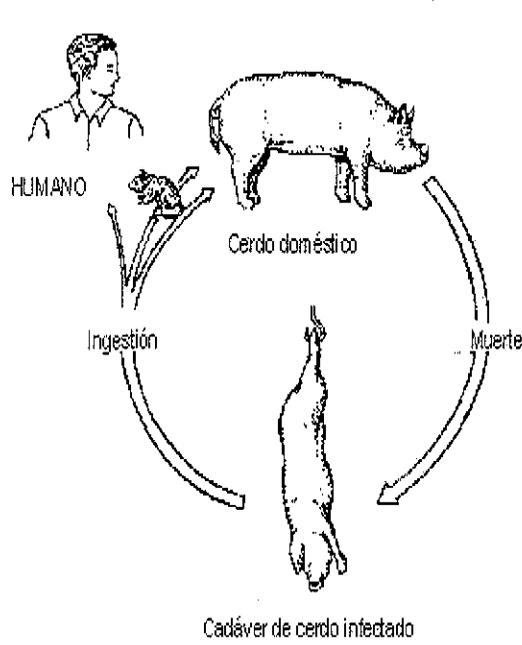
la fuente mas importante de infección con *T. spiralis* en el ciclo doméstico, donde la rata es un reservorio importante del parásito.^{9,12}

Hasta el año de 1975, nunca se había considerado a los hervíboros como una fuente potencial de infección de *Trichinella* para humanos, solo la carne de cerdo y sus derivados eran hasta ese momento considerados como su única fuente de infección.

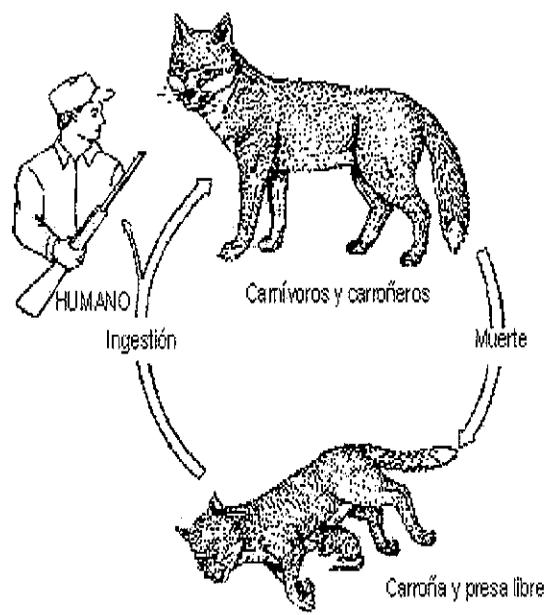
Actualmente se sabe que la carne de caballo no está exenta de la presencia del parásito, por el contrario, estudios realizados por Arriaga, et al (1995) y Pozio et al (1997) indicaron que el caballo es un hospedero natural de *Trichinella*, lo que implica un riesgo en su transmisión y de estos estudios se enfatizó la necesidad de considerar al herbívoro doméstico y silvestre como una posible fuente de infección de triquinelosis para humanos.^{10,11}

1.1.e. Variación intraespecífica

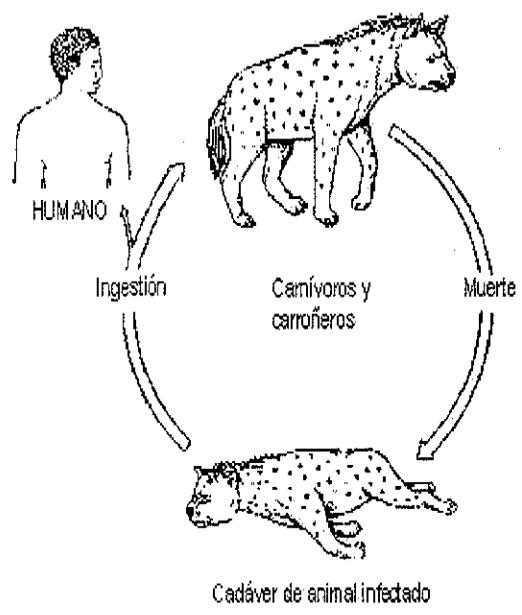
Por mucho tiempo se consideró a *T. spiralis* como la única especie del género *Trichinella*. Actualmente se sabe que existen mas especies de *Trichinella*, las cuales se han clasificado de acuerdo a diferentes características tanto geográficas como biológicas. La **Tabla 1** muestra los criterios que se han utilizado para la caracterización de diferentes aislados geográficos de este parásito, sin embargo las diferencias entre las especies de *Trichinella* en algunos casos son muy pequeñas lo que dificulta y pone en controversia su designación taxonómica Pozio et al (1992)¹³ clasificaron al género en 8 taxa, 5 elevados a especie (*T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. pseudospiralis*) y 3 genotipos de nivel taxonómico incierto *Trichinella* T5, T6 y T8.



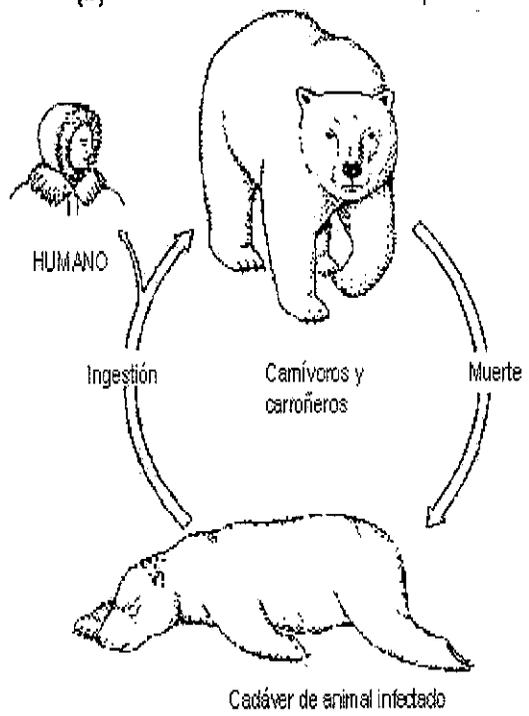
(a) Ciclo doméstico



(b) Ciclo silvestre-Zonas templadas



(c) Ciclo silvestre-Zona tropical



(d) Ciclo silvestre-Zonas frías

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Fig.1. Tipos de ciclos de *Trichinella spp* en animales (Tomado de Campell, 1988)⁹.

Tabla 1. CRITERIOS PARA LA CARACTERIZACION DE AISLADOS DE *Trichinella* spp.

a) Biología ¹⁴	h) Caracterización de antígenos ^{24,25,26}
b) Distribución geográfica ^{13, 15}	i) Sensibilidad a los antihelmínticos ^{27, 28,29}
c) Infectividad y patogénesis en hospederos no humanos ^{16,17,18,19}	j) Características de enzimas e isoenzimas ^{15,30,31,32}
d) Resistencia de la larva a bajas temperaturas ²⁰	k) Análisis genético por PCR ^{33,34,35,36}
e) Producción de larvas recién nacidas por gusanos hembras in vitro ²¹	l) Sondas de DNA ³⁷
f) Supervivencia después de la congelación ²²	m) Número y forma de cromosomas ³⁸
g) Caracterización de la respuesta inmune ²³	

El número indica la cita bibliográfica de la que fue tomado el dato.

Estudios recientes realizados por Pozio y La Rosa (2000), establecieron una sexta especie, *T. murrelli*, para las especies silvestres de regiones templadas de Norteamérica previamente designada como T-5.³⁹ Una séptima especie, la segunda con la larva en músculo no encapsulada, fue recientemente descubierta en cerdos domésticos y silvestres de Papua, Nueva Guinea y fue descrita como *T. papuae*.⁴⁰ El estatus de T-6, un tipo genético similar a *T. nativa* todavía no se ha resuelto, y aunque se encuentra en animales silvestres de zonas árticas, posee un bajo nivel de resistencia a la congelación y diferencias moleculares respecto a *T. nativa*.^{13,41} La T-8, se encuentra más relacionado a *T. britovi*, pero su tipo genético tampoco se ha resuelto, debido a que el primero no es resistente a la congelación y solo se encuentra en animales silvestres del sur de África.^{13, 31,32} Un noveno genotipo fue

denominado como T-9 e identificado en animales silvestres de Japón pero de éste se están realizando nuevos estudios⁴² (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las principales características de las siete especies del género *Trichinella*⁴³.

Especie	<i>T. spiralis</i> Cosmopolita	<i>T. nativa</i> Ártico	<i>T. britovi</i> Paleártico Templado	<i>T. nelsoni</i> África Tropical	<i>T. murrelli</i> Neártico Templado	<i>T. pseudoespiralis</i> Cosmopolita	<i>T. papuae</i> Papua, NuevaGuinea
Adulto macho (longitud)	1.0-1.8	1.0-1.8	0.99-1.91	1.0-1.8	0.91-1.089	0.6-0.9	0.81-1.06
Adulto hembra (longitud)	1.37-3.7	1.3-3.7	2.2-3.4	1.3-3.7	1.55-1.81	1.26-2.10	0.88-1.31
Larva en músculo (longitud)	0.61-1.0	0.61-1.0	0.86-1.0	0.61-1.0	0.84-0.92	0.62-0.76	0.88-1.38
Encapsulación en músculo	SI	SI	SI	SI	SI	NO	NO
Producción de larva "recién nacida" (In vitro) en 72 horas	110 ±2.6	29.8±2.0	47.4±1.2	47.0±3.2	30.6±1.9	48.5±3.1	N.D.
Índice de capacidad reproductiva en ratas Wistar.	185-237	0.02-0.2	0.2-1.0	0.4-0.8	0.7-1.2	47-62	N.D. (5.3 en ratón)
Desarrollo de célula nodriza (días post- infección)	16-34	20-30	24-42	34-60	24-70	N.A.	N.A.
Infectividad en cerdos (larva/ g músculo)	171.5	0.15	30.6	58.6	2.4	23.9	N.D.
Resistencia a la congelación g (días -30°C)	0	1.5-2.5	1.0	0	0	0	N.D.

N.A. No analizado

N.D. No Determinado

1.1.f. Morfología

Las formas adultas son pequeñas y delgadas. Los machos miden aproximadamente de 1.4 a 1.6 mm de largo por 60µm de diámetro máximo. El extremo anterior es relativamente delgado mientras que la parte posterior lleva un par de papilas largas, situadas en cada lado del orificio cloacal. El testículo es simple y se sitúa a corta distancia del extremo posterior del cuerpo; puede extenderse hacia delante hasta

aproximadamente la mitad del cuerpo y se une al tubo genital que a su vez se despliega en sentido posterior hasta la cloaca. La hembra mide entre 3 a 3.5 mm de largo por 60 a 90 μm de diámetro. Tiene un solo ovario el cual se sitúa en la parte posterior de su cuerpo junto al oviducto, el receptáculo seminal, el útero y la vagina formando un canal casi recto hasta la vulva, situada en la parte ventral de su cuerpo. El útero contiene huevos en la porción posterior, mientras que la parte anterior contiene a las larvas juveniles incubadas.^{44,45}

En ambos sexos, la parte anterior del cuerpo está ocupada por el esticosoma, un cordón compacto de células glandulares, dispuestas linealmente llamadas esticocitos. Anterior al esticosoma, se encuentran el esófago el cuál es muscular, posterior al esticosoma hay una unión con el intestino, a través de un tubo simple, el cuál se extiende hasta el ano. La boca lleva un estilete con el cuál el parásito puede penetrar en el epitelio intestinal del hospedero.^{1,44}

Las larvas liberadas por la hembra miden aproximadamente 100 μm y se conocen como recién nacidas a diferencia de las que se establecen en el músculo llamadas L1 y que pueden alcanzar hasta 1mm de longitud (**Fig.2**). La presencia de las larvas en el músculo estriados causa degeneración de la fibra muscular: el sarcolema se engruesa y los núcleos se hacen más numerosos, la estriación de la fibra se pierde, rompiéndose ésta y aparecen focos de degeneración adiposa. Al mismo tiempo, el tejido conjuntivo reacciona formando una cápsula de protección alrededor de la larva conocida como "célula nodriza", la cápsula esta compuesta de colágena tipo IV y VI⁴⁶ la cuál se rodea por una porción única de vasos y vénulas que comienzan su formación a partir del día 12 al 20 después de la infección intracelular que le permite al parásito obtener

nutrientes, eliminar desechos y sobrevivir dentro del hospedero por mucho tiempo.⁴⁷ Después de un periodo de 6 meses, la cápsula protectora comienza a calcificarse, completando este proceso en un término aproximado de 18 meses. A pesar de la calcificación, las larvas permanecen vivas en la célula nodriza durante años y se ha reportado que en el humano pueden vivir hasta 31 años⁴⁸ (Fig. 3).

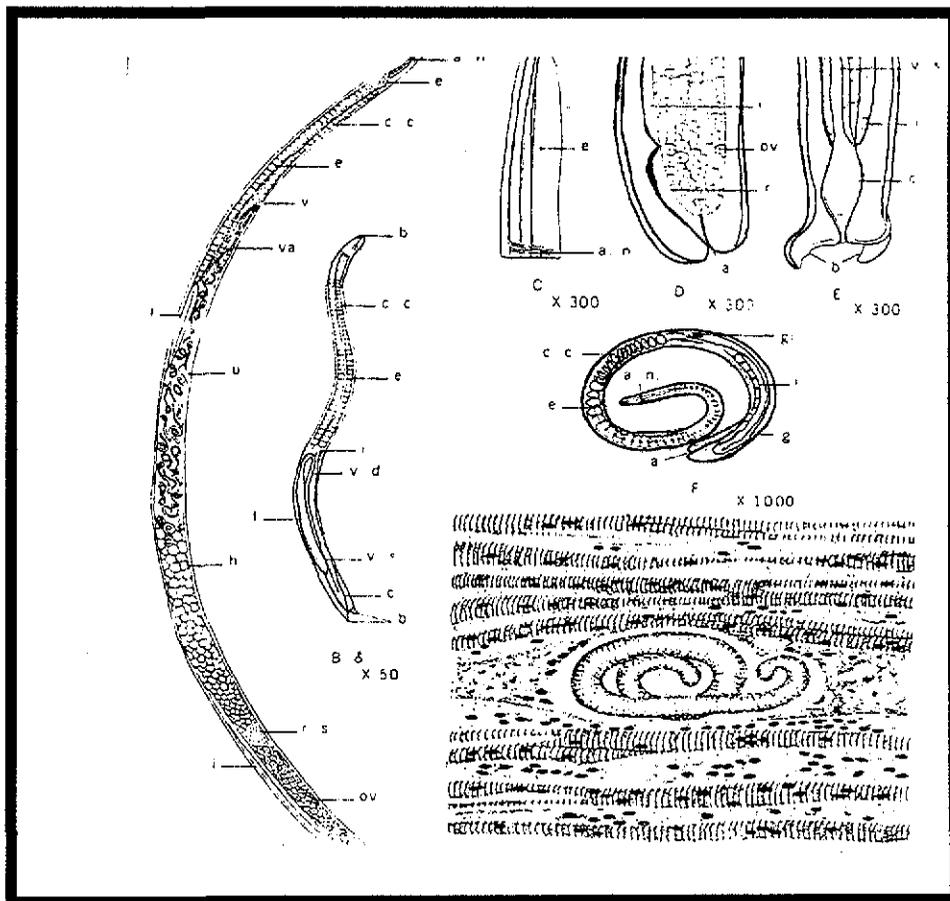


Fig. 2. Presentación esquemática de las diferentes fases de *Trichinella spiralis*. A. Hembra adulta; B. Macho adulto; C. Extremo anterior del gusano; D. Extremo posterior del macho; F. Larva joven; G. Larva enquistada en músculo. a, ano; b, bolsa; c, cloaca; c.c., cuerpos celulares; e, esófago; g, gónadas (esbozo); gr., gránulos; i, intestino; b (parte superior), boca; a.n., anillo nervioso; h, huevos; ov., ovario; r recto; r.s., receptáculo seminal; v.s. vesícula seminal; t, testículos; u, útero con larvas; v, vulva; va., vagina; v.d., conducto deferente. (Tomado de Brown y Neva, 1985)⁴⁹

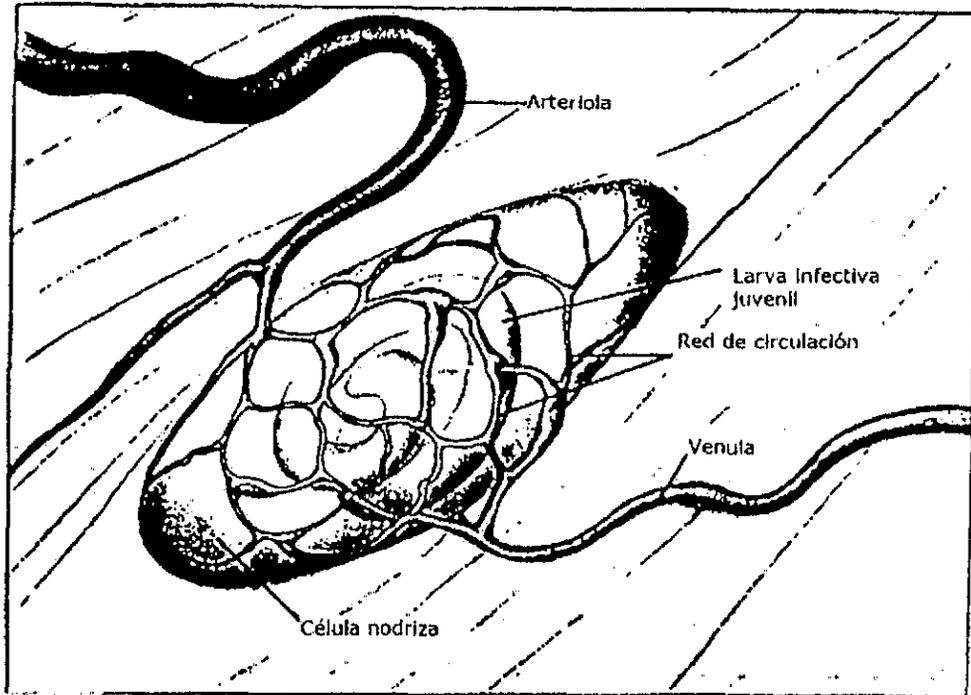


Fig. 3. Presentación esquemática de un complejo intacto de célula nodriza - parásito. Tomado de Despommier, 1990³.

1.1.g. Ciclo de vida de *T. spiralis*.

El ciclo de vida de *T. spiralis* es muy característico porque el mamífero sirve como hospedero definitivo e intermediario. Existe muy poca especificidad debido a que una gran variedad de mamíferos pueden alojar tanto a los parásitos en fase adulta como a las formas larvarias.

Un mamífero se infecta al ingerir carne y / o embutidos que contengan larvas infectantes de *T. spiralis*, una vez dentro de su estómago, las larvas se liberan de su célula nodriza por la acción de los jugos gástricos hasta alcanzar la madurez en el intestino delgado mediante cuatro mudas. Macho y hembra copulan y la hembra penetra a las células epiteliales del intestino donde libera a las larvas "recién nacidas"

(LRN) que penetran a los espacios de vasos linfáticos del intestino^{50,51} hasta llegar a la sangre venosa; algunas entran a la cavidad peritoneal y pueden pasar de ésta a la región del tórax y penetrar a la vena porta hepática y llegar al corazón. Después de haber llegado a la sangre, las LRN son llevadas a todo el cuerpo del hospedero, muchas de ellas llegan por esta vía a los tejidos y si no pueden sobrevivir allí mueren. La mayoría de las larvas que sobreviven se alojan especialmente en los músculos estriados y en particular en el diafragma, la lengua, los músculos maceteros, la laringe y los músculos deltoides y gemelos; cuando son muy numerosos, los parásitos pueden alojarse en otros músculos esqueléticos.¹

Al llegar al músculo, penetran el tejido y crecen hasta que alcanzan una longitud de 1mm aproximadamente. El ciclo se cierra, cuando otro animal ingiere carne infectada con la larva de *T. spiralis* permitiendo la sobrevivencia del parásito^{47,48}

(Fig 4).

Trichinella spiralis

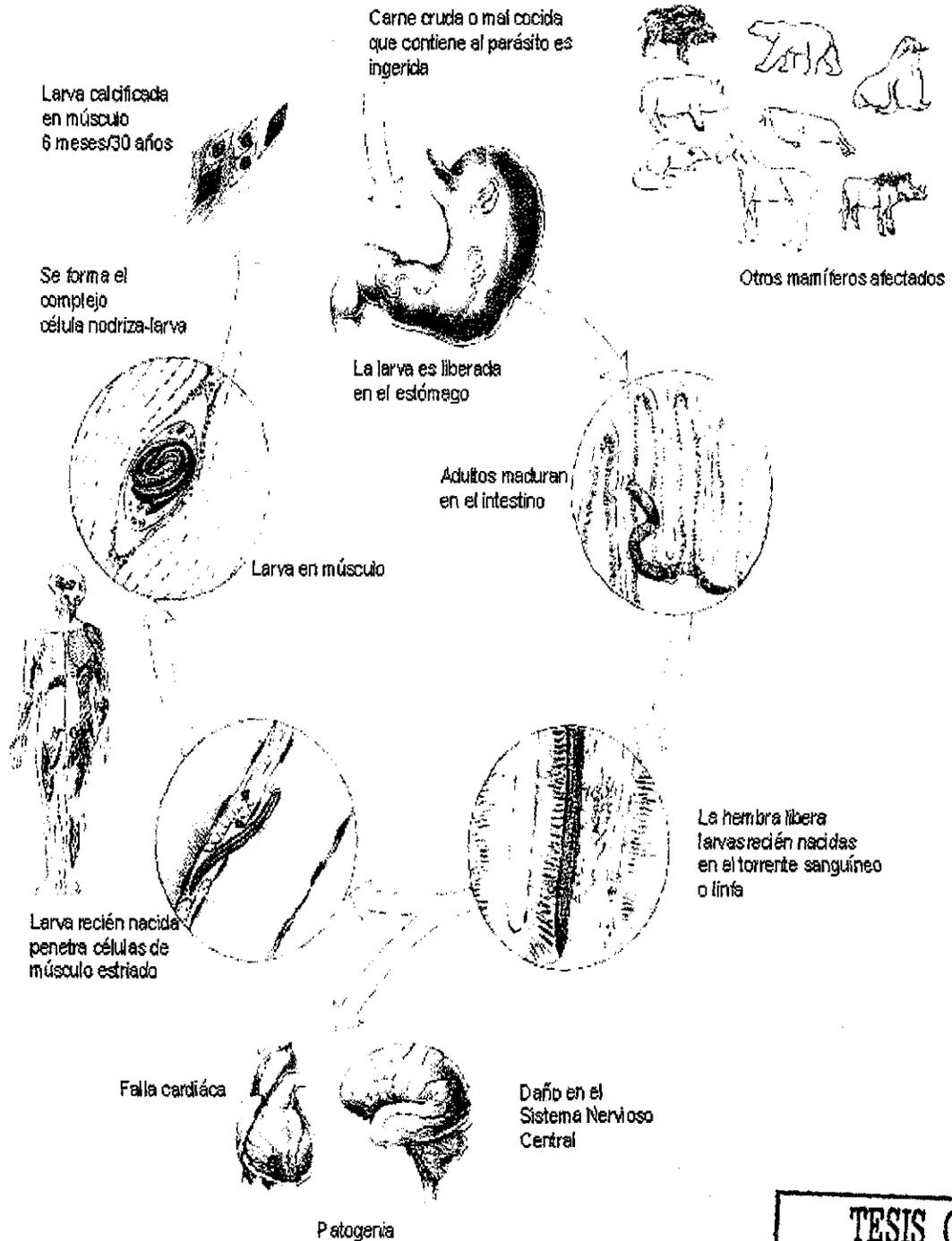


Fig. 4. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Modificado de Despommier, 1990³.

1.2. Triquinelosis

1.2.a. Epidemiología de *T. spiralis*.

1.2.a.I. Distribución geográfica mundial

La triquinelosis es cosmopolita, pero debido a sus hábitos alimenticios, tiene menor importancia para los habitantes de los trópicos y de oriente con relación a Europa y Estados Unidos de América. Las medidas de control aplicadas en los últimos 35 años en los Estados Unidos, tuvo como resultado una significativa disminución de la prevalencia de la triquinelosis humana. Los casos reportados desde 1947 a 1981, fueron un total de 7531, con un número de 132 casos mortales⁵². Actualmente, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC)⁵³ indicó que entre 1991 a 1996 hubo un decremento en el número de casos reportados por cada año, los cuales aún son asociados con la ingestión de productos derivados de la carne de cerdo.⁵⁴ En Canadá, los casos de triquinelosis que se reportaron están directamente involucrados con la ingesta de carne de animales silvestres.^{55,56} Mientras que en Latinoamérica, la enfermedad tiene prevalencia en las regiones de Sudamérica, especialmente en Chile, Uruguay, Argentina, Ecuador y Brasil,^{57,58,59} así como también en América Central, con excepción de Costa Rica, donde no se han reportado casos.¹

En Europa, se reportaron casos que indicaron que la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida, aunque su incidencia es relativamente baja en países como Holanda, Alemania y España, mientras que en Dinamarca no se han registrado casos, sin embargo la incidencia es muy elevada en Polonia, Lituania, Hungría, Bulgaria, Rusia, Italia y Francia.⁶⁰ En Asia, los brotes de triquinelosis se reportaron en Laos, Malasia, Vietnam y Tailandia. En Australia no hay casos humanos reportados² (Fig.5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

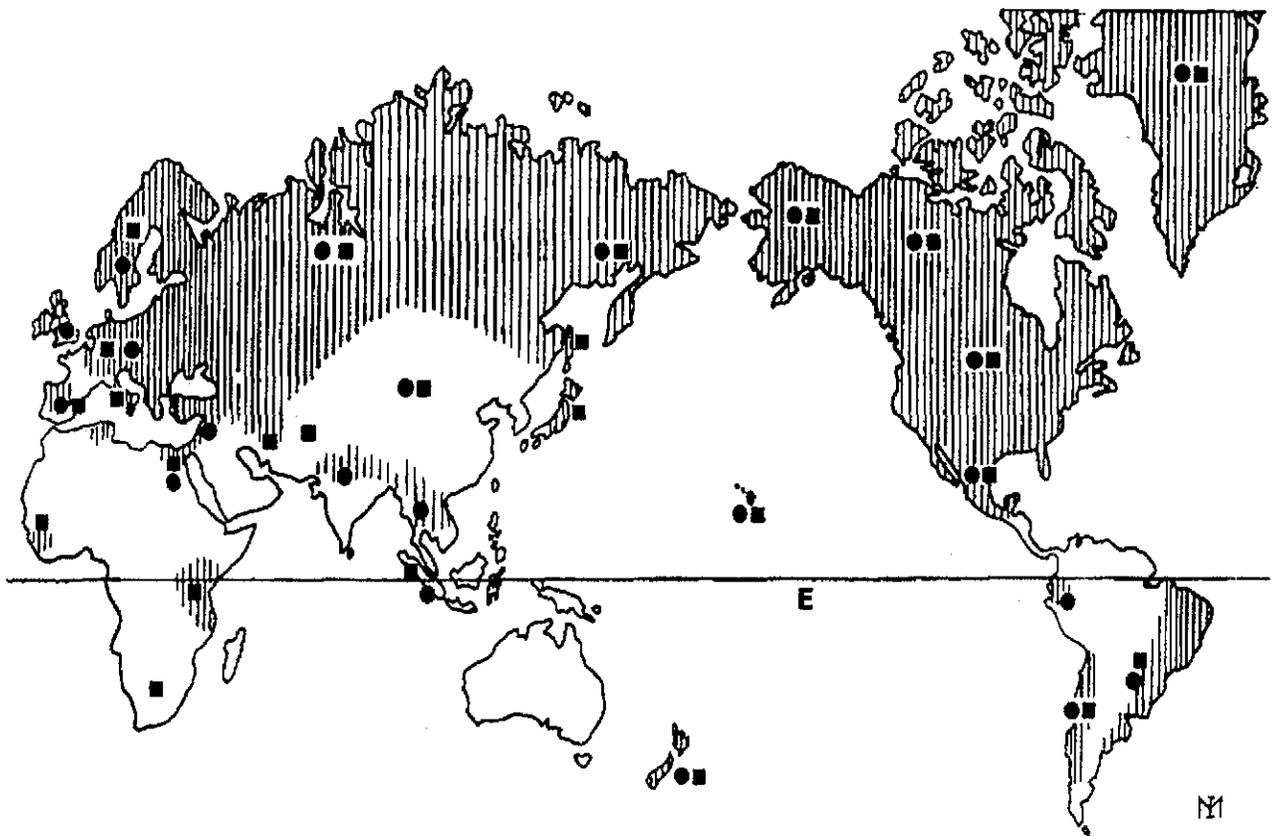


Fig. 5. Distribución geográfica mundial de triquinelosis. Area rayada, pacientes detectados. Círculos negros, casos de cerdos infectados. Cuadros negros otros mamíferos infectados.

1.2.a.II. Distribución en México

Los diversos estudios realizados hasta ahora sobre la situación de la triquinelosis en México (**Fig. 6**), se han descrito en 3 períodos: el primero (1981 a 1896) con los trabajos de Barragán, Zúñiga, Toussaint y Olvera quienes demostraron la existencia del parásito en humanos y cerdos. Encontraron la infección con mas frecuencia en ganado proveniente de otros países de América que en México y confirmaron experimentalmente la destrucción del parásito por efectos de cocción y fritura. A partir

de 1942 hasta 1955 se inicia el segundo período, en éste, los trabajos de Perrin y Mazzotti determinaron los rasgos epidemiológicos y la epizootiología de la infección por *T. spiralis*. El tercer periodo a partir de 1974 se caracterizó por el reconocimiento clínico de la enfermedad debido a los mas de 180 casos diagnosticados en los años 70s . Este periodo involucra lo realizado hasta la fecha, reportando un número de casos que no determinan la situación real de la triquinelosis en México, debido a que muchos casos principalmente humanos, no son registrados, reportados o su fuente de información proviene de comunicaciones personales. La **tabla 3** presenta una síntesis de los casos humanos reportados en México desde 1893 a la fecha.

La búsqueda de larvas de *T. spiralis*, también se ha realizado en tejidos musculares de otros animales que son importantes en la dinámica de transmisión debido a que esta parasitosis es una zoonosis. Los estudios de Nuñez et al. (1948), señalaron un porcentaje del 25% de gatos de la ciudad de México infectados con *T. spiralis*,⁸⁷ mientras que Mazzotti en 1954 en un análisis de 900 diafragmas de ratas encontró 2% de animales infectados.⁸⁷ Contreras et al. (1992), examinaron los músculos de diafragmas de 600 cerdos sacrificados en el rastro municipal de la ciudad de Zacatecas, de este estudio el 0.33% de diafragmas resultaron positivos por el método de compresión directa y 1.33% fueron positivos por el método de digestión artificial. Estos datos mostraron que de cada 100 cerdos sacrificados en este rastro, un animal estaba infectado con *T. spiralis*, lo que le permitió sugerir que esta forma de infección, es un riesgo que puede constituir una fuente potencial de infección para el humano.⁸⁸

Tabla 3. Casos y brotes de triquinosis en México

Lugar	No. de casos	Método de diagnóstico	Referencia
México, D.F.	1	Biopsia	Ramírez (1983) ⁶¹
México, D.F.	4	Biopsia	Barragán (1893) ⁶²
México, D.F.	12	Biopsia	Olvera (1896) ⁶³
México, D.F.	25	Biopsia	Perrín (1939) ⁶⁴
México, D.F.	30	Biopsia y Digestión artificial	Mazzotti y Chavira, (1943) ⁶⁵
México, D.F.	48	Digestión artificial	Mazzotti y Pastrana (1943) ⁶⁶
México, D.F.	18	Intradermoreacción	Perrín (1942) ⁶⁷
México, D.F.	179	Prueba intracutánea de Bachman	Mazzotti y Lozano (1944) ⁶⁸
México, D.F.	20	Biopsia	González et al. (1975) ⁶⁹
Chiapas	17	Fluculación con bentonita	Cabrera (1979) ⁷⁰
Edo. de México	4	Biopsia y pruebas serológicas	Martínez-Marañón (1979) ⁷¹
Zacatecas	6	Biopsia	Martínez-Marañón (1979) ⁷²
México, D.F.	5	Biopsia	Díaz et al. (1979) ⁷³
Zacatecas	18	Necropsias y pruebas serológicas	Fragoso (1981) ⁷⁴
Edo. de México	4	Biopsia y fluculación con bentonita	Martínez-Marañón (1983) ⁷⁵
Zacatecas	19	Clinica y eosinofilia progresiva	Villacaña et al. (1984) ⁷⁶
Zacatecas	7	Clinica y eosinofilia progresiva	Martínez-Marañón et al. (1985) ⁷⁷
Durango	9	Clinica y eosinofilia progresiva	Rocha et al. (1986) ⁷⁸
México, D.F.	1	Biopsia y clínica	Martínez-Pantaleón et al. (1986) ⁷⁹
México, D.F.	65	Clinica, eosinofilia y ELISA	Sarti et al. (1989) ⁸⁰
México, D.F.	4	Encuestas epidemiológicas, clínica, eosinofilia, biopsia y contraelectroforésis	Saltigeral et al. (1989) ⁸¹
México, D.F.	13	Clinica, eosinofilia y biopsia	Rojas et al. (1989) ⁸²
Zacatecas	166	Clinica y biopsia	Cabral-Soto et al. (1990) ⁸³
México, D.F.	4	Biopsia	Zamora-Chavez et al. (1990) ⁸⁴
México, D.F.	8	Clinica, hemaglutinación indirecta, contraelectroforésis	Alvárez-Chacón et al. (1992) ⁸⁵
México, D.F.	7	Hemaglutinación indirecta	Martínez et al. (2000) ⁸⁶

*Todos los datos fueron tomados de reportes notificados en diversas referencias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estados Unidos de América



Fig. 6. Distribución en México de brotes de triquinelosis animal y humana. **Estados con alta incidencia:** 1. Durango, 2. Zacatecas, 3. México, 4. Distrito Federal. **Estados con mediana incidencia:** 5. Chihuahua, 6. Jalisco, 7. Michoacán. **Estados con menor incidencia,** 8. Aguascalientes, 9. Sonora, 10. Hidalgo, 11. Querétaro, 12. Guerrero, 13. Guanajuato y 14. Veracruz. El mapa muestra datos actualizados por Ortega-Pierres et al (2000).⁵⁹

1.2.b. Mecanismos de patogenicidad

La infección por *T. spiralis* provoca gran variedad de respuestas en el hospedero en las distintas fases del ciclo de vida: 1) durante la penetración de los parásitos a través de la membrana a la mucosa intestinal, 2) durante la migración de las larvas y 3) cuando la larva se transforma a una miofibrilla o célula muscular en célula nodriza.^{89,90} La fase intestinal conocida como enteral, incluye 4 estadios larvarios y los estadios adultos, inmaduro y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

maduro. La penetración a la mucosa intestinal por los adultos de *T. spiralis* causa daño traumático en un periodo de 12 horas a 2 días después que la larva infectiva entra en el huésped. Los metabolitos tóxicos que excretan los parásitos así como la presencia de bacterias de la flora entérica que penetran a través de las heridas, provoca lesiones caracterizadas por inflamación y dolor lo que según diversos reportes en casos extremos puede causar septicemia y con ello la muerte.⁷ La inflamación se caracteriza por una reacción celular intensa que consiste de eosinófilos, neutrófilos, células cebadas y linfocitos. Las reacciones tóxicas se manifiestan con náuseas, vómitos, fiebre, diarrea y aspiración perfusa. Hay dificultad para respirar, erupción de manchas rojas en la piel e inflamación en el rostro. Esta fase de triquinelosis usualmente termina de 5 a 7 días después de aparecer los primeros síntomas.⁹⁰

La larva penetra en los capilares y nódulos linfáticos mesentéricos y durante su migración el daño involucra a los vasos sanguíneos, lo que provoca edema generalizado en cara y manos.

La fase parenteral se caracteriza por la migración de las larvas a través de los tejidos y la penetración de éstas en las fibras del músculo esquelético. El paso de las larvas puede causar neumonía, encefalitis, pleurismo, meningitis, nefritis, daño a los ojos y sordera. La situación es más problemática para el hospedero cuando se ven involucrados corazón y sistema nervioso central. En el miocardio, la larva migra pero no se enquistada y provoca necrosis y fragmentación de fibras musculares, la miocarditis que se induce es transitoria porque la larva sale del miocardio poco tiempo después de la penetración. Sin embargo, en el sistema nervioso central las larvas tienden a deambular lo que provoca un daño antes de dejar el tejido para reintegrarse al torrente sanguíneo.^{7,91} Después de 10 días de que los primeros síntomas aparecen, las larvas

recién nacidas comienzan a penetrar las fibras musculares que se transforman a célula nodriza. Hay alteraciones bioquímicas que están muy relacionadas con los cambios estructurales. Según las observaciones de Stewart en 1974, hay un decremento en la mioglobina y reducción en diversos componentes celulares que se involucran en la concentración de energía: ATP, fosfocreatina y creatina.⁹²

Durante la etapa parenteral de la infección, también puede detectarse un incremento en las enzimas asociadas con la miodegeneración, como la fosfatasa ácida y la lisozima,⁹³ con el consecuente decremento en las proteínas de miofibrillas, lo que origina contracciones derivadas de una miositis.⁹⁴ El nivel de la respuesta inflamatoria que se genera en el hospedero aumenta el daño a los miocitos y se relaciona directamente con la patogenia de la triquinosis.⁹⁵ Los eosinófilos, células directamente involucradas en el proceso inflamatorio aparece alrededor del día 14 post-infección y alcanzan su pico máximo en el día 20, posteriormente disminuye gradualmente hasta el día 14 de infección.^{96,97}

Los cambios degenerativos en el músculo están relacionados con el número de larvas en los tejidos así como con el tiempo que dura la infección. Estudios realizados en diafragmas de humanos, demostraron que *T. spiralis* afecta la habilidad del músculo para generar estrés, trabajo y fuerza en su funcionamiento normal y reduce la resistencia a la fatiga, sin embargo, la disfuncionalidad antes mencionada corresponde al inicio de la infección cuando hay relativamente pocas larvas en el músculo, lo que indicó que *T. spiralis* tiene un efecto de daño en el tejido, antes de su encapsulación y su relación a la respuesta inflamatoria y al efecto de los productos de excreción-secreción.⁹⁸ Como consecuencia del daño muscular hay intenso dolor en éstos, dificultad para respirar, masticar, hablar, debilidad en la presión sanguínea y pulso, así

como parálisis espástica. Cuando afecta miocardio, hay daño cardíaco y desordenes nerviosos. Cuando afecta el sistema nervioso central puede originar alucinaciones⁹⁰. La **Tabla 4** resume el desarrollo de *T. spiralis* y los cuadros clínicos correspondientes.

Tabla 4. Cuadro sinóptico de las fases biológicas progresivas del desarrollo de *T. spiralis* y los correspondientes cuadros clínicos

Fase biológica	Comienzo	Manifestaciones clínicas
Las larvas ingeridas se desenquistan y penetran en el epitelio intestinal	2-4 horas	
Los gusanos maduran y copulan	24 horas	Síntomas gastrointestinales
Las hembras depositan las larvas que invaden los músculos esqueléticos	30 horas 6 días	
Invasión máxima de la fibra muscular	7 días 10 días	Edema de cara y fiebre Fiebre máxima (40-41°C)
Disminución de larviposición	11 días 14 días	Miositis y dolores reumáticos
Larvas en los músculos totalmente diferenciados	17 días	Eosinofilia y anticuerpos circulantes
Encapsulación precoz	20 días 21 días	La eosinofilia alcanza su máximo
Intestino prácticamente libre de formas adultas	23 días	Miocarditis o encefalitis
Encapsulación prácticamente completa	26 días 1 mes 2 meses	Síntomas respiratorios Desaparece la fiebre
Vida máxima de los gusanos en el intestino	3 meses	Gran probabilidad de muerte por miocarditis o encefalitis
Puede empezar la calcificación de la célula nodriza	6 meses 8 meses	Convalecencia lenta Desaparecen los síntomas neurológicos y la miocarditis
La calcificación de la célula nodriza puede completarse	1 año	

Las larvas pueden seguir viables dentro de la célula nodriza

Tomado de Beaver, 1986¹ y Faust, 1961⁶

1.2.c. Tratamiento

Aunque se ha demostrado que varios compuestos son capaces de destruir a *T. spiralis* o de obstaculizar la oviposición, no se ha establecido un tratamiento específico para esta parasitosis. Debido a que la triquinelosis no siempre puede diagnosticarse en la fase intestinal, su tratamiento rara vez se considera en esta fase de la enfermedad. Si la enfermedad se diagnostica o se sospecha de su existencia, es difícil iniciar una

medicación para prevenir o minimizar la producción de larvas y la subsecuente invasión al músculo. El tratamiento a seguir, está directamente relacionado con el grado de avance de la enfermedad, para aliviar el dolor y el malestar y cuando la enfermedad es de larga duración, se incluye además del tratamiento sintomático, los fármacos antihelmínticos específicos y una terapia definida puede ser crucial en el resultado de casos severos.²²

1.2.c.I. Tratamiento sintomático

El tratamiento está basado en el uso de analgésicos y antipiréticos, así como el reposo en cama, cuyo su objetivo es aliviar mialgias y manifestaciones toxicoantigénicas. Se pueden administrar analgésicos comunes, antiinflamatorios, esteroidales y corticosteroides, éstos últimos son adecuados para evitar las reacciones alérgicas provocadas por la muerte de los parásitos. Para aplicar una terapia adecuada es necesario prevenir el peligro de exacerbación de la enfermedad, debido a que la supresión causada por esteroides en la inmunidad puede prolongar la infección de la fase intestinal e incrementar el número de larvas que invaden el tejido del hospedero.^{1,22}

1.2.c.II. Terapia específica

- Fase intestinal

Aunque la triquinelosis rara vez se diagnostica en la fase intestinal, el tratamiento directo contra los adultos y preadultos de *T. spiralis* se puede indicar bajo 2 circunstancias a) en infecciones prepatentes, específica en casos donde se conoce la cantidad de carne infectada, pero los síntomas están asociados con la diseminación de la larva que ya no aparece y b) en pacientes cuando la diseminación de la larva ocurrió por larviposición de gusanos adultos. La aplicación de los antihelmínticos que se utilizan

contra la fase crónica de la triquinelosis es importante para una terapia temprana y efectiva, particularmente en los primeros tres días después de la infección.

- Fase prepatente

El reconocimiento de la fase prepatente es muy rara y el inicio de un tratamiento tiene como objetivo prevenir la función reproductiva de los gusanos adultos. Si la carne infectada se ingirió 24 horas previas, es posible en base a diversos estudios que las formas preadultas puedan ser destruidas con medicamentos como pirantel, oxantel, tiabendazol, mebendazol o albendazol. Si entre el intervalo de ingestión de carne y el tratamiento es mayor a 24 horas, pirantel y levamisol pudieran, en teoría, ser usados para eliminar los gusanos adultos. En el caso de pirantel una dosis de 10 mg/kg por 5 días se ha sugerido en las bases de la experimentación clínica.⁹⁹

- Infección patente

La situación es similar a la infección prepatente, excepto que la invasión de la larva en el músculo ya ocurrió. Las opciones para el tratamiento son las mismas que las que se usan en el periodo de infecciones prepatentes de mas de 24 horas de duración se intenta prevenir el daño en el músculo. En la práctica los compuestos derivados del benzimidazol son los que se puede usar. El más antiguo de los fármacos que se utilizó es el tiabendazol a dosis de 50 mg/ kg de peso a partir del segundo día de la ingesta de carne infectada para evitar la aparición de síntomas y si se administraba entre el quinto y noveno día después de la infección, se lograba mitigar en gran medida la enfermedad, sin embargo, debido a las reacciones secundarias que por su uso se presentaron durante el tratamiento, hoy en día este medicamento casi no se utiliza.¹⁰⁰ Actualmente el medicamento mas eficaz contra la triquinelosis es el albendazol.¹⁰¹

1.2.d. Prevención y control

El ahumado, la salazón y el desecado de la carne no son medidas eficaces para eliminar la infección por larva muscular. La refrigeración a -5°C durante un periodo no inferior a 20 días, a -25°C durante 10 días o a -28°C durante 6 días o la congelación profunda -37°C , constituyen un tratamiento eficaz de la carne de cerdo que contiene aislados de zonas templadas del parásito.¹

Considerando que la principal fuente de transmisión de la triquinelosis al humano es la carne de cerdo es importante considerar diversas medidas de control encaminadas a evitar la infección tanto en el humano como en el cerdo.

Prevención de la infección del cerdo. Se consigue con la crianza higiénica, en chiqueros bien contruidos alejados de la basura y de las ratas.

Prevención de la infección del humano. En este aspecto convergen una serie de medidas: a) educación sanitaria dirigida a crear el hábito de ingerir carne de cerdo y sus derivados adecuadamente cocidas, b) centralización de la matanza de cerdo en establecimientos sujetos a la inspección de carnes por parte de personal técnico idóneo y responsable y c) tratamiento de las carnes por el frío durante un tiempo prolongado, la congelación brusca a muy bajas temperaturas o el uso de sustancias radioactivas como Co^{58} . Sin embargo estas medidas son ineficaces y requieren de un gran despliegue de recursos materiales y tecnológicos que están muy alejados de la realidad socioeconómica de los países en desarrollo¹⁰².

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3. Métodos de diagnóstico

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El diagnóstico de la triquinosis humana depende de una combinación de aspectos epidemiológicos, signos, síntomas y pruebas de laboratorio, las cuales están directamente relacionadas con el tratamiento que debe sugerirse. Por tal motivo, el diagnóstico de este parásito deberá contemplar las etapas: de invasión en el intestino, de migración de la larva recién nacida por el torrente sanguíneo y la fase en que el parásito invade los músculos de su hospedero.

1.3.a. Métodos de diagnóstico directos (Métodos parasitológicos)

La comprobación parasitológica es difícil porque requiere de un método directo para el hallazgo de larvas por biopsia muscular. Tras la llegada de las larvas al músculo esquelético, puede establecerse específicamente el diagnóstico mediante la demostración de organismos libres o encapsulados en pequeñas muestras comprimidas de los músculos deltoides, bíceps, gemelos, y sobre todo pectorales a partir de una biopsia.

Inicialmente otro aspecto de gran importancia en la prevención de la transmisión de la triquinosis al humano es el diagnóstico específico y sensible de todos los animales infectados con el parásito que representan una fuente de transmisión de esta parasitosis. En el caso del diagnóstico de triquinosis en animales procedentes de los rastros, se emplean principalmente los métodos parasitológicos como la triquinoscopia y la digestión artificial y ambos métodos se basan en la detección de la larva en el músculo. El método directo de compresión o triquinoscopia, requiere colocar una porción del músculo de interés entre dos portaobjetos sujetos por tornillos, posteriormente a la muestra se le agrega una gota de eosina y el tejido comprimido se

observa al microscopio con pequeño aumento.^{1,69} El uso del triquinoscopio permite la detección de un número menor de parásitos en la muestra, además del análisis de una cantidad mayor de muestras en un tiempo más reducido que cuando se emplea un microscopio simple, por lo que es útil en los rastros para analizar canales porcinos. Aunque éste es un método confirmativo, si la infección no se detecta se debe a dos factores que se consideran como desventajas: 1) que el hospedero presente una carga parasitaria baja y 2) que la muestra se tomó en etapas tempranas de la infección, cuando las larvas no se establecen en el músculo.

El otro método parasitológico, la digestión artificial, permite obtener la larva de *T. spiralis* a través del tratamiento de la muestra de tejido muscular que se utiliza para el análisis con una solución artificial de jugo gástrico que contiene una enzima (pepsina) y ácido clorhídrico al 1% que en su conjunto liberan a las larvas de la tejido y pueden ser colectadas posteriormente por medio de un embudo de Baerman (un embudo que en su tallo tiene conectado un tubo de ensayo por medio de un tubo de látex).¹⁰³ La cuantificación de parásitos en la muestra se determina al analizar el sedimento con un microscopio. Por esta técnica se puede detectar 1 larva/g de músculo lo que representa la cantidad mínima para inducir triquinelosis clínica en el humano¹⁰⁴. Aunque la sensibilidad de esta técnica es mayor que el método de compresión, su realización es costosa, consume mayor tiempo para realizarse y tiene las mismas desventajas que tiene la triquinoscopía.

En rastros rurales, la triquinoscopía es el método de rutina que se utiliza para el control de la triquinelosis porcina, no obstante, Prost, et al (1959), comprobaron que el uso de este método en cerdos con infecciones leves por *T. spiralis* pasó por alto el 25% de casos positivos¹⁰³. Otro estudio realizado por Van Knappen (1980), estableció mediante

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

un análisis a cerdos infectados experimentalmente con 500 a 1500 larvas de *T. spiralis* que entre un 10 y 20% de casos positivos se detectaron por triquinoscopía, en comparación con un 50% de casos positivos en los mismos cerdos a través del método de digestión artificial ¹⁰⁴. Acha y Szyfre (1989) y Soulé y Dupouy Camet (1991), consideraron al método de triquinoscopía menos sensible que el método de digestión artificial, datos que coincidieron con lo que previamente se reportó por otros autores ^{58,105} Sin embargo, Vignau et al. (1997) realizaron un estudio comparativo entre las dos técnicas antes mencionadas y consideró que las diferencias atribuidas a la sensibilidad entre triquinoscopía y digestión artificial estaban asociadas a probables errores en la aplicación del método ya que los resultados de su trabajo, reportaron similitud entre ambas técnicas. ¹⁰⁶

Actualmente para elaborar este tipo de técnicas de diagnóstico es importante complementarlas o sustituirlas por otras técnicas más sensibles y específicas que permitan la atención a todos los animales infectados con *Trichinella*.

1.3.b. Métodos clínicos

Los métodos clínicos para el diagnóstico de la triquinelosis incluyen 1) la historia natural de la enfermedad, 2) la exploración física y 3) las pruebas paraclínicas.

Al referirse a la historia natural de la enfermedad en el humano es importante conocer el tipo de alimentos ingeridos, los signos clínicos que se manifiestan durante las 5 semanas previas a la consulta y se deberá considerar los probables cambios en la sintomatología relacionados al tiempo de evolución del padecimiento. La exploración física permite hacer evidentes los síntomas de la triquinelosis, como el dolor muscular y de articulaciones, disturbios visuales, así como el edema periorbital, lesiones hemorrágicas en los glóbulos oculares y la fiebre. Finalmente, entre las pruebas

paraclínicas de mayor valor para el diagnóstico se encuentran la determinación cuantitativa de eosinófilos circulantes, niveles de enzimas séricas como la CPK (difosfofructoaldolasa) y deshidrogenasa láctica (LDH) y el electrocardiograma. Sin embargo, éstas no son pruebas confirmatorias exclusivas de la enfermedad. La CPK y LDH incrementan a partir de la segunda semana de la infección y persisten hasta la quinta semana ²⁴.

1.3.c. Pruebas serológicas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los últimos años una serie de técnicas de inmunodiagnóstico se desarrollaron con el objeto de detectar la presencia de anticuerpos anti- *T. spiralis*. Muchas de estas pruebas serológicas fueron poco sensibles y específicas para detectar anticuerpos producidos en una infección leve y se puede presentar una interpretación errónea de los resultados cuando no se usan antígenos específicos y bien definidos ¹⁰⁷.

Técnicas como la **precipitación en anillo**, han permitido detectar casos humanos de triquinelosis, ¹⁰⁸ sin embargo el éxito de esta técnica no logró complementarse debido a la detección de reacciones falso positivas con otras enfermedades como la mononucleosis infecciosa. ¹⁰⁹ **La microprecipitación** ¹¹⁰, se utilizó como otra forma de diagnóstico para *T. spiralis*, su aplicación requirió del uso de la larva muscular o el estado adulto como antígeno, a éste se le adicionó el suero del paciente y si había anticuerpos contra el parásito, la reacción se manifestaba con la formación de un precipitado alrededor de los orificios bucal y anal del gusano después de 24 horas de incubación. La técnica representó un alto grado de especificidad pero la necesidad de contar con el parásito viable y el tiempo de consumo para su realización impidieron el uso rutinario de esta técnica. Otra prueba, **la doble inmunodifusión** utilizó como antígeno, extractos solubles totales de la larva que se obtenía de músculo. La técnica

requería de 24 - 48 horas para indicar resultados y no detectó bajos niveles de anticuerpos. Su sensibilidad fue similar a la microprecipitación.¹¹¹

La reacción de **fijación del complemento** demostró su utilidad para el diagnóstico de la triquinelosis en estudios epidemiológicos, mediante la detección del antígeno o de anticuerpos en fluidos biológicos^{112,113}. Se consideró una prueba muy superior a la de precipitación por tener menos reacciones falso positivas y se detectó su utilidad hasta después de 12 meses de infección. Kagan en 1974 reportó que la prueba tuvo variabilidad en sensibilidad y especificidad y adoleció del inconveniente de utilizar reactivos difíciles de conseguir y preparar.¹⁰⁸

La **contrainmunolectroforesis** se utilizó por primera vez para el diagnóstico de triquinelosis humana por Despommier et al. (1986) con una fracción antigénica "P" enriquecida con gránulos de esticocitos de larva en músculo y 104 sueros humanos con síntomas clínicos de triquinelosis y con una reacción positiva a la floculación con bentonita. Sus resultados indicaron que del total de sueros que se analizaron solo 94 dieron reacción positiva por contrainmunolectroforesis¹¹³. El ensayo fue sensible específico y rápido de realizar, sin embargo su utilidad se restringió a un solo grupo de antígenos y al elevado costo para su realización. Para mejorar la sensibilidad de esta prueba, Dzbinski et al. (1974) emplearon antígenos marcados con C¹⁴ y revelaron la reacción por autorradiografía, sin embargo el tiempo de realización fue muy largo y por tal motivo el ensayo dejó de usarse.¹¹⁴

Basado en **reacciones de aglutinación** y por tratarse de una prueba simple, rápida y reproducible, la **floculación con bentonita** fue el ensayo de inmunodiagnóstico de mayor utilidad para detectar casos de triquinelosis. En esta prueba, se reportó una sensibilidad del 97% y una especificidad del 90% en títulos de diagnóstico desde 1: 5

que llegaron a ser tan altos como 1: 160 y persistir por años aunque en títulos mas bajos¹¹⁵. Las pruebas de floculación fueron mas simples para el diagnóstico serológico de la triquinelosis, pero la técnica no encontró una amplia aplicación debido a la dificultad de combinación de los antígenos del parásito con los acarreadores (colesterol, látex y bentonita). No obstante, la técnica de floculación con bentonita se utilizó mucho en el diagnóstico habitual y se aplicó como técnica estándar para el diagnóstico de triquinelosis en laboratorios centrales de referencia. Aunque por este método se detectaron reacciones falsas positivas y reacciones falsas negativas¹¹⁶.

Kagan y Bargai (1956), emplearon la técnica de **hemaglutinación** para el diagnóstico serológico de la triquinelosis en infecciones experimentales en ratas y conejos¹⁰⁸, mientras que Price y Weiner (1956) empleando la misma técnica para el diagnóstico de infecciones humanas observaron un 100% de sensibilidad de esta prueba respecto a la de fijación por complemento y un 300% más sensible que la prueba de precipitación. A pesar de ser una prueba útil en el diagnóstico, presentó el inconveniente de producir notables variantes por azar¹¹⁷.

La prueba **de inmunofluorescencia** para el diagnóstico de la triquinelosis en un principio representó una alternativa que se usó por diversos investigadores, que les reportaron resultados diferentes con relación a la especificidad y sensibilidad de acuerdo a la fuente de antígeno utilizada,^{118,119,120,121}. Otro estudio realizado por Ivanoska et al.(1989) reportó el 100% de casos positivos en pacientes con signos clínicos y síntomas indicativos de triquinelosis en comparación con un grupo de pacientes con sintomatología clínica de otro tipo, pero sospechosos a la infección con *T. spiralis*, en ellos se detectaron anticuerpos anti- *T. spiralis* en un 46% de muestras.¹²² La aplicación de este método en el diagnóstico de la triquinelosis la realizó Sadun et al.

(1962) quienes utilizaron larvas muertas obtenidas de músculo como antígeno ¹²³. Posteriormente Sultzer (1965) utilizó la cutícula del parásito con el propósito de obtener antígeno más estable y obtuvo los mismos resultados que los que se obtuvieron con el antígeno total.¹²⁴

En la actualidad, para la aplicación de este método de diagnóstico se utilizan cortes congelados de larvas así como el parásito completo como antígeno. Ljungstrom et al. (1983) y Saathoff et al. (1986), reportó que la inmunofluorescencia directa fue un método específico y detectó anticuerpos a partir del sexto día de aparición de las manifestaciones clínicas la enfermedad, el patrón de tinción en cortes de la larva se distribuyó tanto en la cutícula como en el esticosoma e intestino. Los anticuerpos presentes durante la infección fueron: IgA que persistieron después de 4 meses, IgM hasta 5 meses e IgG que se detectó en un 50% de los pacientes después de 2 años de infección. Este método fue mas sensible que la fijación por complemento, hemaglutinación y doble inmunodifusión con una inespecificidad muy baja. Los autores confirmaron la importancia de la utilidad de esta técnica como diagnóstico para la triquinelosis humana, pero al no poder aplicarse con facilidad en áreas rurales debido al equipo especial que requiere para realizarse, sus perspectivas fueron limitadas^{125,126}.

Con este antecedente Ben et al. (1997), aplicaron la **inmunohistoquímica enzimática** para detectar casos de triquinelosis en humanos. De acuerdo con sus resultados, la técnica no mostró resultados falso negativos y por las características de ser barata, sencilla y altamente reproducible a temperatura ambiente se consideró útil en estudios de áreas endémicas principalmente y de éstas en zonas rurales ¹²⁷.

Con relación a técnicas inmunoenzimáticas, desde su introducción en 1976, el **ELISA** se ha usado con éxito para detectar la enfermedad en el humano como en el cerdo.

Engvall y Ljungromm (1975), aplicaron por primera vez el ELISA en el diagnóstico de la triquinelosis humana con un antígeno de extracto salino total de la larva que se obtuvo de músculo. Como resultado, estos investigadores confirmaron la alta sensibilidad de la prueba pero no se descartó la reacción cruzada en 5 sueros de pacientes con filarías. Un aspecto importante en este tipo de diagnóstico fue la identificación de antígenos que tuvieron como característica principal su alta especificidad inmunogénica¹²⁸. A este respecto diversos estudios reportaron antígenos a partir de un extracto crudo de larva de *T. spiralis*¹²⁹, parcialmente purificados y productos de excreción secreción derivados "in vitro" a partir de la larva obtenida de músculo¹³⁰, que en conjunto fueron altamente sensibles y específicos para los ensayos de ELISA¹³¹. A este respecto los ensayos serológicos del tipo de ELISA e inmunotransferencia (IET) representaron una alternativa al diagnóstico de triquinelosis porcina, en la literatura existen varios reportes de la utilidad de antígenos purificados a partir de la larva muscular de *T. spiralis* con el uso de estas técnicas, que han permitido un diagnóstico sensible y específico del parásito en cerdos, además se ha sugerido que la IET puede usarse como un método de diagnóstico confirmativo y que el patrón de reconocimiento antigénico de la larva muscular que se obtiene con suero de animales está muy bien caracterizado.^{132,133}

Otros trabajos reportaron el ELISA indirecto para el inmunodiagnóstico de *T. spiralis* en humanos y cerdos y al tomar en cuenta la sensibilidad y especificidad del ensayo sus resultados dependieron mucho de la calidad de los antígenos^{134,135}. Mahannop et al. (1995), utilizaron un antígeno a partir de extracto crudo de larvas para detectar anticuerpos en sueros de 2 grupos de pacientes y controles sanos; sus resultados indicaron una sensibilidad del 100% en sueros de pacientes con triquinelosis confirmada a los 57 días después del consumo de carne de cerdo infectada¹³⁶. Estos

resultados con un antígeno somático crudo, les permitió comparar su efectividad a la del antígeno de excreción-secreción en términos de sensibilidad. Aunque el antígeno somático crudo fue muy específico (96.8%) con relación al antígeno de excreción-secreción que tuvo el 100%, la diferencia y posible ventaja del primer antígeno fue su fácil preparación, su bajo costo y su capacidad de detectar infecciones cuando los pacientes desarrollaron síntomas e ingresaron al hospital lo que lo hizo mas factible en comparación con el antígeno de excreción- secreción que detectó casos positivos 2 meses después de la infección. Sin embargo, los ensayos serológicos realizados con el extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* no evitaron las reacciones cruzadas con otro tipo de parasitosis como : capilariasis, gnathostomiasis, opistorquiasis, estrongiloidiasis e infecciones por uncinarias¹³⁶ y aunque los autores propusieron el uso alterno de IET que identificó la proteína antigénica de 109 kDa específica para *T. spiralis*, el análisis serológico a través de un antígeno crudo como el que usaron los autores limitó sus funciones.

Es importante hacer mención que este tipo de ensayos con el uso de antígenos purificados, reduce considerablemente las reacciones falso positivas con otros parásitos, pero todos ellos están encaminadas al diagnóstico tardío de la infección, cuando el parásito está establecido en el músculo.

1.3.d. Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Desde su creación la amplificación de segmentos de DNA mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se utiliza en muchos laboratorios con múltiples aplicaciones en diferentes campos de la biomedicina. Dentro del campo de la microbiología, la PCR se utiliza para el diagnóstico rápido y preciso de infecciones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

producidas por bacterias, hongos y virus y es particularmente útil en aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológicos directos y de cultivo, como ejemplo están las enfermedades infecciosas como el SIDA, hepatitis viral B y citomegalovirus¹³⁷. En el campo de la parasitología, esta técnica ha sentado las bases para el desarrollo de una nueva generación de métodos diagnósticos basados en la identificación del material genético de diferentes parásitos. Las ventajas de la PCR para la detección de *Cryptosporidium* spp en muestras clínicas, fueron: su alta sensibilidad, facilidad para su uso, la ventaja del análisis de varias muestras al mismo tiempo, relativo bajo costo, y la eliminación de falsos positivos encontrados en reacciones cruzadas de anticuerpos a especies de protozoarios no patógenas y la tipificación potencial de sus aislados¹³⁸.

Sondas específicas para hibridación e iniciadores específicos para realizar la PCR, se desarrollaron para designar la identificación de otros parásitos protozoarios como *Plasmodium* spp, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp y *Trypanosoma cruzi*, demostrando la eficiencia e importancia de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico de parasitosis^{139,140}.

A la fecha, *Trichinella* es motivo de diversos análisis a nivel genético, de ésta forma, se considera que el tamaño del genoma de *T. spiralis* es de 2.53×10^8 pares de bases y consiste de aproximadamente 42% de secuencias repetidas¹⁴¹. Se han llevado a cabo estudios para distinguir diferencias entre especies de *Trichinella*, basados en los patrones de secuencias repetidas obtenidos de digestión del DNA genómico con endonucleasas¹⁴². Dos familias de secuencias de DNA repetido de diferentes aislados se analizaron: la familia de 1.7 kb de *T. spiralis*¹⁴³ y la familia de 482 pb UPB3.7¹⁴⁴. La familia de DNA repetido de 1.7 kb consiste de 2800 copias y la secuencia del

monomero se determinó a partir de ésta y se diseñaron iniciadores para el diagnóstico de la triquinelosis por PCR, así como en la identificación de especies. Posteriormente este fragmento se clonó en un plásmido puC9 (pPra) y su secuencia fue determinada por de Vos et al. (1988)¹⁴⁵. Dupouy-Camet et al. (1991) utilizó la PCR para amplificar un fragmento de la secuencia repetida (pPra) en ratones infectados experimentalmente con *T. spiralis*. Los autores obtuvieron 2 productos de amplificación de 800 y 602 pb empleando 2 ng de DNA que correspondió a 0.02 de larva de *T. spiralis*¹⁴⁶. Bajo las mismas condiciones no se obtuvo amplificación de DNA de *T. nativa*, lo que indicó que la secuencia era exclusiva de *T. spiralis*. El resultado de este trabajo, confirmó lo realizado por Dick et al. (1990) quienes con la técnica de hibridación y una sonda con pPra, no hibridó con el DNA extraído de una cepa tipo silvestre de *T. nativa*¹⁴⁷, además demostró que el fragmento fue específico para detectar infecciones por aislados de tipo doméstico y propone a la técnica de PCR como alternativa en estudios epidemiológicos o en la clasificación de diferentes aislados de *Trichinella*. Un año más tarde Dick et al. (1992)¹⁴⁸, desarrolló iniciadores basados en secuencias de DNA repetidas del fragmento de 1.6 kb que le permitieron amplificar por PCR, DNA de aislados porcinos de *Trichinella* a partir de una sola larva en tejido muscular. Los iniciadores pPra, identificaron aislados de *T. spiralis* como porcinos a pesar de la fuente geográfica y el origen de la especie hospedera. Los estudios realizados por PCR antes mencionados, se realizaron a partir de DNA de larva muscular y/o de músculos de animales infectados con el parásito durante la fase tardía de la infección. Sin embargo mediante la PCR, existen posibilidades para el diagnóstico de la triquinelosis, en la fase temprana de la infección. Durante el ciclo de vida de *T. spiralis*, la larva recién nacida migra a través del torrente sanguíneo a las células musculares, siendo en este período

cuando se puede hacer un diagnóstico temprano de esta parasitosis y permitir el empleo de fármacos que tengan efectos contra el parásito e impedir que cause daño a nivel muscular. Soulé et al (1993) detectaron por PCR empleando los mismos iniciadores pPRA¹⁴⁹, del parásito en sangre de caballos experimentalmente infectados. Los productos de amplificación obtenidos fueron los específicos de 602 y 800 pb así como una amplificación inespecífica de 200 pb entre los 6 y 14 días post-infección. Los animales se re infectaron nuevamente con *T. spiralis* pero el DNA del parásito no se detectó en sangre y los autores lo atribuyeron a una reacción inmune a nivel intestinal que provoca una rápida expulsión de gusanos adultos y la posterior inhibición de la instalación de la hembra, así como la destrucción de la larva recién nacida. Posteriormente, Robert et al. (1996) usaron la técnica de PCR con los iniciadores de la secuencia repetida de 1.6 kb mencionada anteriormente como específica para *T. spiralis*^{157,159}, con el objeto de detectar larvas en sangre que se colectó en pacientes durante la cuarta a sexta semana después de haber obtenido la infección y que estuvo relacionada al consumo de carne de caballo durante un brote en París en 1993. Sus resultados presentaron la detección de 2 pacientes positivos de un total de 37, evento normal, si se considera que la toma de la muestra se realizó en el periodo de la fase muscular la enfermedad, donde se observaron cargas parasitarias bajas (1 ó 2 parásitos por cada 100 mg de músculo en cada biopsia positiva). Sin embargo los resultados que se obtuvieron en este trabajo fueron interesantes, debido a que demostró la utilidad de la PCR como técnica de diagnóstico en humanos, que sería mejor evaluada en la fase temprana de infección¹⁵⁰.

Posteriormente Uparanukraw y Morakote (1997), confirmaron el uso de la PCR para detectar larvas recién nacidas de *T. spiralis* en sangre de ratones infectados

experimentalmente¹⁵¹. Los autores utilizaron dos diferentes iniciadores pPRA y TsP49, homólogos por amplificar el fragmento de DNA de 850 pb. Sus resultados demostraron que con el uso de la PCR fue posible detectar DNA del parásito en la fase temprana de infección en ratones infectados experimentalmente y que los iniciadores pPRA amplificaron fragmentos de 850, 650 y 250 pb, mientras que con los iniciadores TsP49, se observó que no siempre se detectó la amplificación del fragmento de 650 pb en las muestras de sangre analizadas. Esta diferencia en los resultados obtenidos se explicó por los autores, a que los iniciadores derivados de pPRA amplifican un alto número de copias de DNA repetido de 1.6 kb, mientras que el número de copias del gene P49 que derivó los iniciadores TsP49 no se ha determinado. Estos estudios muestran lo realizado por Soulé et al. (1993)¹⁴⁹ ratificando el uso de la PCR en la detección de una infección temprana provocada por *T. spiralis* en dos modelos animales distintos.

2. JUSTIFICACIÓN

Existen pocos estudios relacionados con la prevalencia de *T. spiralis* en México, y como consecuencia de ello no, se conoce la situación epidemiológica de la enfermedad que produce este parásito, tan solo documentada por algunos casos aislados reportados en diferentes estados de la República Mexicana. El diagnóstico que se realiza actualmente de esta parasitosis está dirigido a la fase tardía de la infección, cuando el parásito se encuentra en músculo dificultando el tratamiento de la triquinelosis, debido a que los fármacos empleados para su tratamiento son menos eficaces en esta fase de la infección. Por tal motivo resulta de interés contar con métodos que permitan el diagnóstico de la triquinelosis durante la fase temprana de infección que facilite su tratamiento impidiendo que el parásito invada y dañe los músculos del paciente. Es por esta razón que técnicas sensibles y específicas basadas en la biología molecular como la PCR, pueden ser aplicadas al diagnóstico de la triquinelosis durante la fase temprana de infección permitiendo un mejor control de esta enfermedad. Sin embargo, es necesario realizar análisis de este tipo de técnicas para su evaluación y estandarización, utilizando un modelo murino que permita posteriormente utilizarlas en el diagnóstico de triquinelosis humana.

3. HIPOTESIS

La amplificación de la secuencia de 1.6 kb (pPRA) de *Trichinella spiralis* en sangre de ratones infectados con el parásito en diferentes días post-infección, permitirá determinar la presencia de DNA de larvas recién nacidas del parásito en periodos tempranos de infección.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Aplicar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección temprana de *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente.

4.2. Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando DNA de larvas recién nacidas (LRN) de *T. spiralis* y los iniciadores pPRA.
- Determinar la sensibilidad de la PCR, empleando diferentes concentraciones de DNA obtenido de LRN de *T. spiralis*.
- Determinar la presencia de larvas recién nacidas (LRN) de *T. spiralis* en sangre de ratones infectados experimentalmente colectada a diferentes tiempos después de la infección.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Parásitos

En este estudio se usó un aislado de *T. spiralis* obtenido de cerdo infectado naturalmente (fase de larva L₁) y mantenida en ratas Wistar, el cual fue proporcionado por el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Las larvas se obtuvieron mediante la digestión con jugo gástrico artificial (pepsina-HCl 1%), a partir de músculo de ratas infectado con el parásito¹⁵²

5.2. Animales de experimentación

Se usaron ratones de la cepa BALB/c hembras de 6 semanas de edad, las cuales fueron mantenidas en ventilación con 15 a 20 cambios de aire por hora, condiciones constantes de luz- oscuridad (10x14 horas), temperatura (20- 23°C) y humedad (40-60%) provistos de alimento y agua *ad libitum*.

5.3. Mantenimiento del ciclo de vida y obtención del parásito a partir de músculo de rata infectada con *T. spiralis*.

Una vez obtenidas las larvas viables se procedió a infectar un lote de 3 ratas tipo Wistar hembras de 6 semanas de edad. La infección se realizó vía oral y a cada rata se le administraron 700 larvas de *T. spiralis* suspendidas en Bactoagar al 0.2% con una jeringa unida a una cánula intragástrica. Los animales fueron sacrificados entre los días 30- 35 post-infección y se obtuvieron las larvas del músculo¹⁵², las cuáles se emplearon

para el mantenimiento del ciclo de vida del parásito y la posterior infección de los animales.

5.4. Infección y colecta de sangre

Un lote de 33 ratones hembras BALB/c de 4-6 semanas de edad se infectó con 300 larvas de *T. spiralis* vía oral. Otro lote se usó como control con el mismo número y características del lote experimental. A los dos lotes se les tomó sangre antes de iniciar el experimento para considerar el día cero. En ambos grupos se sacrificaron en forma aleatoria 3 ratones por cada día que comprendió la cinética de infección: 0,3,5,7,10,12,15,17, 20,22,30 y 35 días post-infección. La sangre se colectó de la vena cava en EDTA 0.5 M, se procesó para la extracción de DNA y se congeló a -20°C hasta su uso¹⁵².

5.5. Obtención del estadio adulto de *T. spiralis* para verificar que los animales estuvieran infectados en la fase temprana de infección

De cada uno de los animales infectados se obtuvo el intestino delgado. El intestino se lavó con amortiguador de fosfatos 1X, se cortó longitudinalmente para exponer el epitelio intestinal, y se fragmentó en cortes de 3 cm que posteriormente se depositaron en embudos de Baerman a 37°C durante 3 horas sin agitación. (Blair, 1983). Posterior a este tiempo se colectó el sedimento con el contenido intestinal, se lavó dos veces con amortiguador de fosfatos 1X y se observó al microscopio¹⁵³.

5.6. Extracción de DNA de sangre de los lotes control y experimental de ratones infectados con *T. spiralis*.

El DNA se aisló de 200 μ l de sangre colectada en EDTA 0.5 M y se siguió el protocolo propuesto por Sambrook et al (1989)¹⁵⁴. A la sangre se le agregó solución de lisis (NaCl 0.1 M y EDTA 0.1M) en una proporción 1:1 con la sangre. A la solución se le agregó Proteinasa K en concentración de 0,1 mg/ ml y SDS 0.5% y se incubó a 55°C en un tiempo mínimo de una hora. Posteriormente, el DNA se extrajo con fenol-cloroformo- alcohol isoamílico, se precipitó con 0.1 volúmenes de NaAc 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. El DNA fue disuelto en TE { Tris-HCl 10 mM (pH 8.0) EDTA 1mM } durante 1 hora a 37°C. Después de otra extracción con fenol-cloroformo y posterior precipitación con NaAc 3M y etanol absoluto durante toda la noche a -20°C se centrifugó a 8000g durante 30 minutos a 4°C y se secó en Speed Vac (Modelo 110-Savant). El DNA se suspendió en 50 μ l de agua y se le determinó concentración y pureza por la absorbancia de rayos UV en espectrofotómetro (Modelo Beckman DU 640).

5.7. Amplificación de DNA por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR se realizó de acuerdo a lo mencionado por Dick et al (1992)¹⁴⁸ en 50 μ l de mezcla de reacción con MgCl₂ 1.5.mM; doxinucleótidos trifosfatados 0.2mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); amortiguador regulador (Tris-HCl pH 8.3, KCl 50 mM) 10X; iniciadores 1 μ M; DNA blanco 500 ng y 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa. Como iniciadores se usaron los oligonucleótidos 5'CTTGTAAGCGGTGGTGCGTA3' y

5'CATAGAGGAGGCAACATTACCT 3' que amplifican la secuencia repetida de la clona p Pra específica para *T. spiralis*.

También se determinó la sensibilidad de la PCR con diferentes concentraciones de DNA de larvas de *T. spiralis* obtenidas de músculo (LM), (500, 300, 200, 100, 50, 30, 12, 6, 2, 1 ng y 500, 200, 100 y 90 pg, así como el DNA equivalente a distinto número de larvas (LM), (200, 100, 80, 70, 60, 50, 30, 20, 15, 10, 5 y 1 larva). La amplificación consistió de 30 ciclos (1 minuto a 93°C, 1 minuto a 55°C y 3 minutos a 72°C en un termociclador programable (Perkin Elmer Cetus). Todos los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados por transiluminador de rayos UV, comparados con marcadores de bajo peso molecular (BioRad) y DNA amplificado de larvas (LM) de *T. spiralis* como control positivo y DNA de sangre de ratón no infectado como control negativo.

5.8 Southern blot

Para realizar la transferencia, los geles fueron tratados previamente con una solución ácida (HCl 0.25 N) que fragmentó el DNA, se desnaturalizó con una solución básica (NaOH 0.5M, NaCl 1.5 M) y se neutralizó con una solución alcalina (Tris-HCl pH 8 y NaCl 1.5M). Los fragmentos de DNA amplificados se transfirieron a la membrana de Nylon Hyband-N (Amershad) por arrastre salino con una solución con alta concentración de sales (SSC 20X)¹⁵⁵.

5.9. Hibridación

Las membranas fueron incubadas en amortiguador de hibridación (SSC 5X, SDS 0.1%, reactivo de bloqueo 0.5%, solución Denhardt 5% y 100 µg/ml de esperma de

salmón), con lo que se prehibridó durante 1 hora como tiempo mínimo e hibridó toda la noche a 65°C con la sonda complementaria marcada con fluoresceína. Posteriormente las membranas se lavaron con amortiguadores de diferente astringencia (SSC2X-SDS 0.1% y SSC 0.1X- SDS 0.1%) a 65°C por 15 minutos cada uno. Se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en Tris-HCl 0.1M pH 7.5 y NaCl 0.1M y en un reactivo de bloqueo (Tris-HCl 0.5% o.1M pH 7.5 y NaCl o.1M) 1 hora a 37°C. Para la inmunodetección, se utilizó un anticuerpo conjugado (antifluoresceína unido a peroxidasa) y la actividad enzimática fue revelada por quimioluminiscencia con el sustrato H₂O₂ y luminol. La membrana preparada se colocó en un cassette de exposición y el film se reveló¹⁵⁵.

6. RESULTADOS

6.1. Infección

6.1.1. Determinación del inóculo adecuado para la infección de ratones BALB/c con *T. spiralis*.

Se analizaron cuatro diferentes inóculos para establecer la mortalidad inducida por un aislado de *T. spiralis* en ratones hembras de la cepa BALB/c. En la **figura 7**, se puede observar que con 700, 500 y 300 larvas se encontraron diferencias en la mortalidad. Con el inóculo de 100 larvas, todos los animales sobrevivieron, sin embargo al concluir 30 días después de la infección, todos los ratones se sacrificaron y se determinó el número de animales infectados. Se encontró que con el inóculo de 100 larvas de *T. spiralis*, 4 de los 15 animales utilizados en este experimento, no se infectaron, lo que corresponde a un 26.6 % de mortalidad, mientras que, con el inóculo de 300 larvas, todos los animales estuvieron infectados.

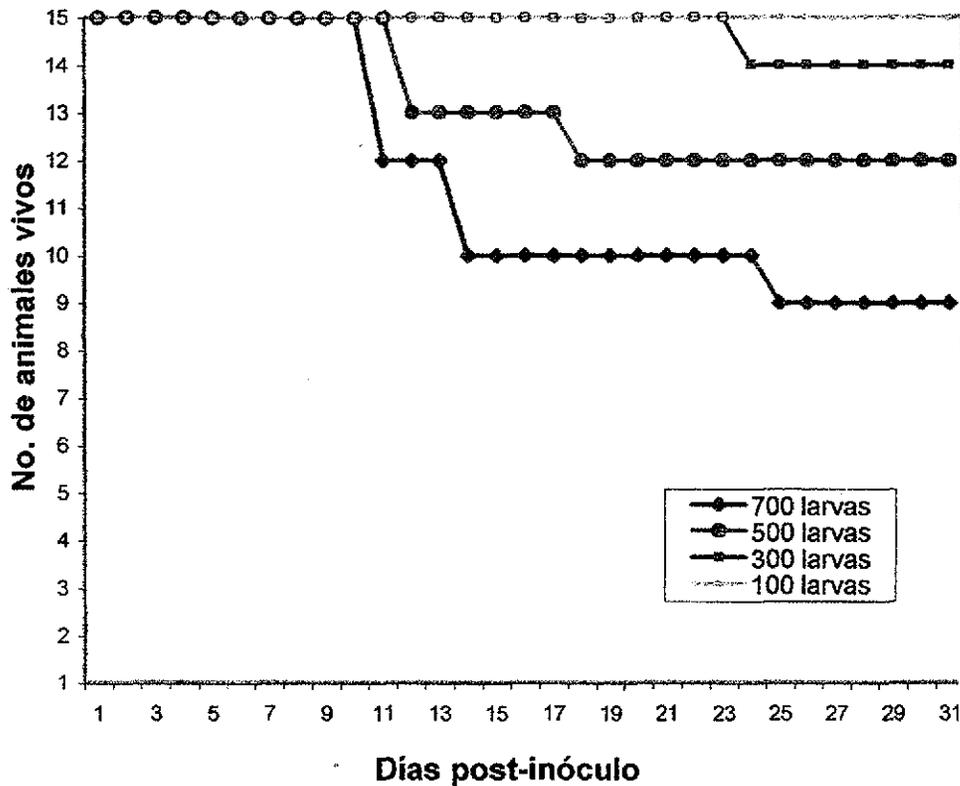


Fig. 7 Determinación del inoculo adecuado para la infección de ratones BALB/c con *T. spiralis*. Se indica el número de animales sobrevivientes respecto al los días post-infección.

6.1.2. Obtención de formas adultas de *T. spiralis*

Se tomó el intestino de cada uno de los 3 ratones correspondientes al grupo experimental y al grupo control negativo de cada día post-infección. El análisis al microscopio de luz con aumento de 40X, de cada intestino, permitió observar parásitos en su fase adulta en todos los ratones infectados con *T. spiralis* desde el día 3 hasta el 17 post-inoculo. Los intestinos de los ratones del grupo control negativo no presentaron parásitos (Fig. 8).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1.3. Obtención de larvas a partir de músculo de rata y ratones infectados con *T. spiralis*

Se obtuvo la fase infectiva de *T. spiralis* (larva L1) mediante la digestión con jugo gástrico artificial (Pepsina-HCl 1%) procedente de músculo de ratas Wistar infectado con *T. spiralis*. La observación al microscopio de luz con aumento 40X estableció la presencia de larvas viables. La viabilidad de los parásitos se determinó mediante la observación de su movimiento. Se obtuvo el músculo de cada ratón correspondiente al grupo experimental y al grupo control negativo, y se realizó el mismo procedimiento mencionado para la obtención de larvas a partir de músculo de rata. Se observó la presencia de larvas de *T. spiralis* en músculo, sin la formación completa de la célula nodriza a partir del día 20 post-infección, en el día 25 ésta formación se observó mas avanzada y en el día 30 se observó a la larva dentro de una célula nodriza completamente formada (**Fig. 9**).

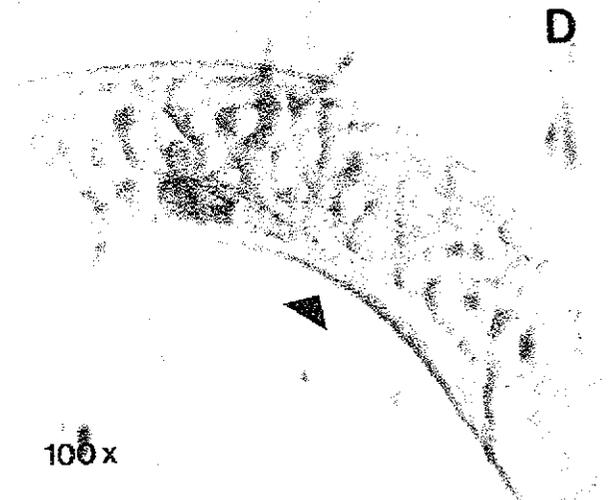
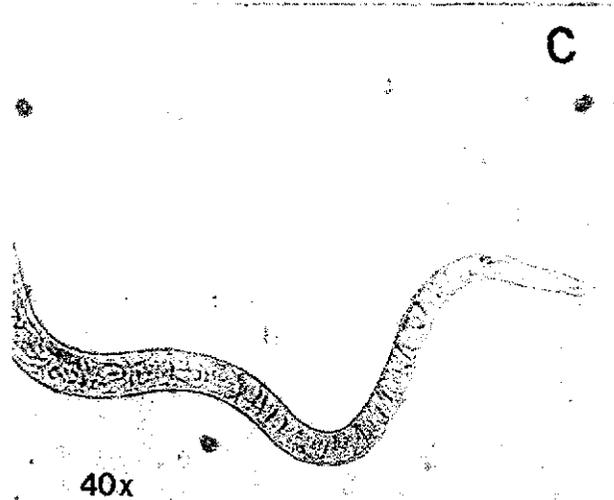
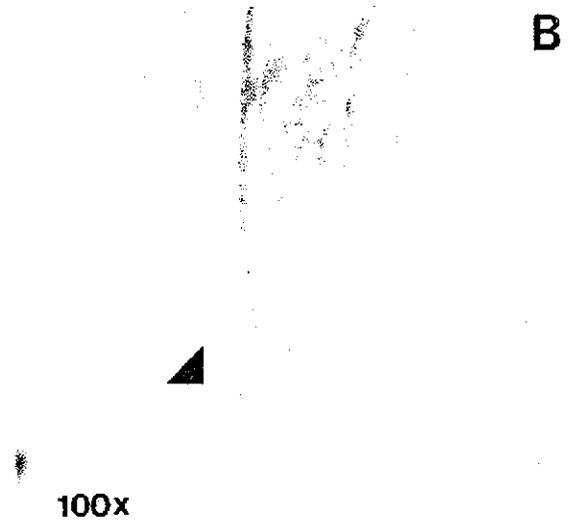
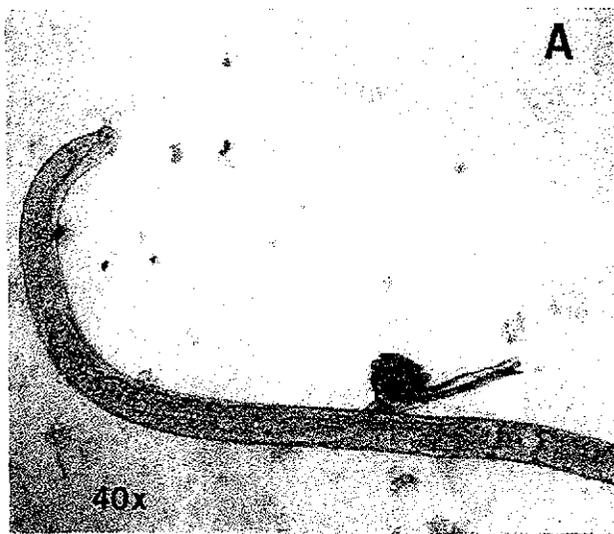


Fig. 8. Observación microscópica de adultos de *T. spiralis* obtenidos a partir de ratones BALB/ c infectados experimentalmente con el parásito. **A.** Macho **B** Acercamiento del macho, mostrando las papilas copulativas. **C** Hembra **D.** Acercamiento de larvas embrionadas dentro de la hembra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

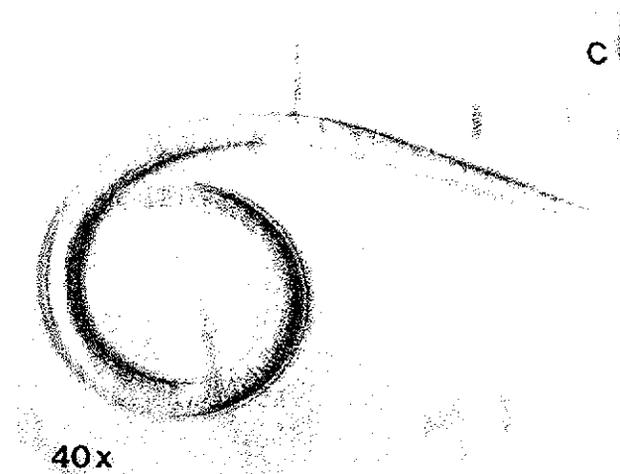
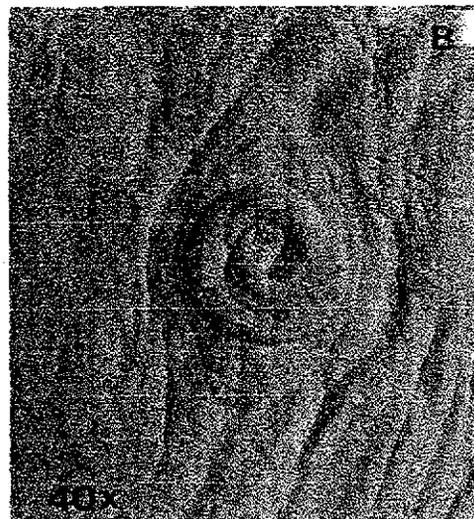


Fig. 9. Observación microscópica de larvas de *T. spiralis* en músculo de ratones BALB/c infectados experimentalmente con el parásito. **A.** Larva en músculo en el día 25 post-infección, la flecha indica su esticósoma. **B.** Larva en músculo en el día 30 post-infección donde se observa la formación completa de la célula nodriza. **C.** Larva digerida por jugo gástrico artificial, liberada del músculo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2. Extracción de DNA de sangre de ratones no infectados e infectados con *T.spiralis*.

Una vez que se realizó la extracción de DNA por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se midió su concentración y pureza en un espectrofotómetro. La pureza se determinó dividiendo los valores de absorbancia 260 entre los valores de absorbancia 280. Posteriormente se analizaron usando geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. Como se puede observar en la **figura 10**, en todos los casos se obtuvo DNA genómico con purezas de entre 1.5 a 1.7. El DNA presentó un alto peso molecular, no mostró signos de degradación y su patrón de migración fue muy similar entre el os.

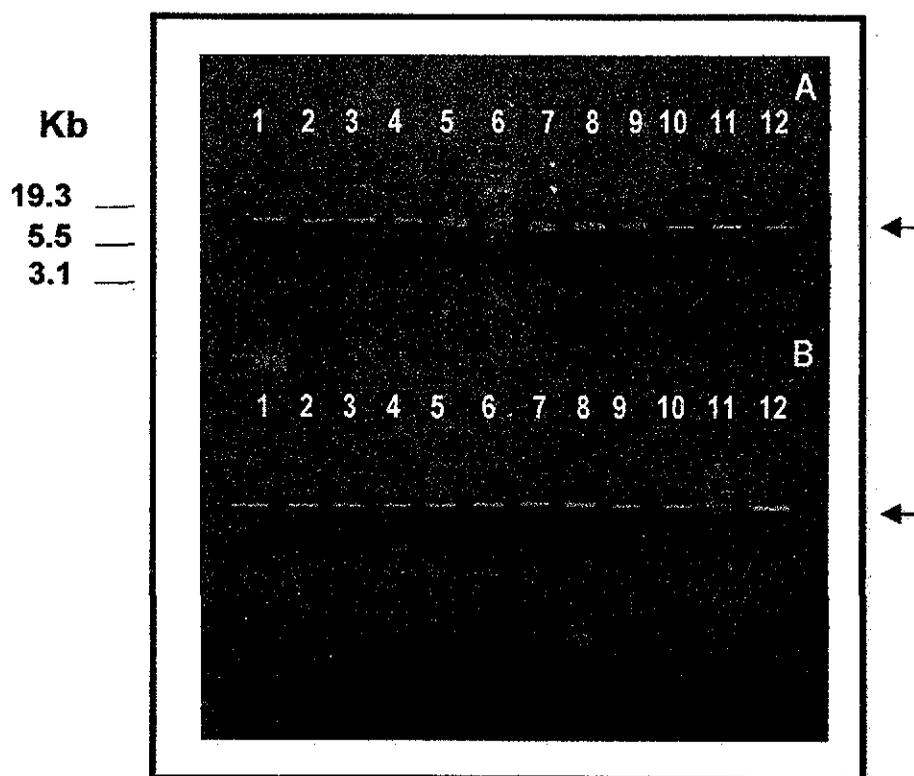


Fig. 10. Análisis electroforético en geles de agarosa al 1% del DNA extraído de sangre de ratones infectados con *T.spiralis* así como de animales no infectados. **A.** Grupo experimental. **B** Grupo control negativo.

6.3. Análisis de productos de PCR obtenidos con diferentes concentraciones de DNA de larvas de *T. spiralis*.

Se procedió a realizar por PCR, el análisis de los productos obtenidos con diferentes concentraciones de DNA de larva (LM) desde 500 ng hasta 90 pg. Se observó que hasta con 100 ng se amplificó el doblete de 600, 800 y una banda de 200 pb, mientras que con 12 ng hasta 500 pg, no se observó la amplificación del producto que corresponde al peso molecular de 200 pb. Se utilizaron controles para dar validez al ensayo y como se observa, el control positivo a partir de una muestra de diafragma de ratón infectado con *T. spiralis*, amplificó los fragmentos esperados de 800 y 600 pb, mientras que el control negativo, procedente de una muestra de sangre de ratón sin infectar, no amplificó nada (Fig 11A).

6.4. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con diferente concentración de DNA de larvas de *T. spiralis*.

Se realizó el análisis por hibridación de los productos obtenidos por PCR con diferente concentración de DNA larvas de *T. spiralis*, con la sonda pPRA, marcada con fluoresceína y revelada por quimioluminiscencia. Se detectaron los productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb observados por PCR y el producto de 600 pb fue el único que se observó cuando se usaron 100 pg de DNA. El fragmento de 200 pb no hibridó con la sonda específica pPRA (Fig 11a).

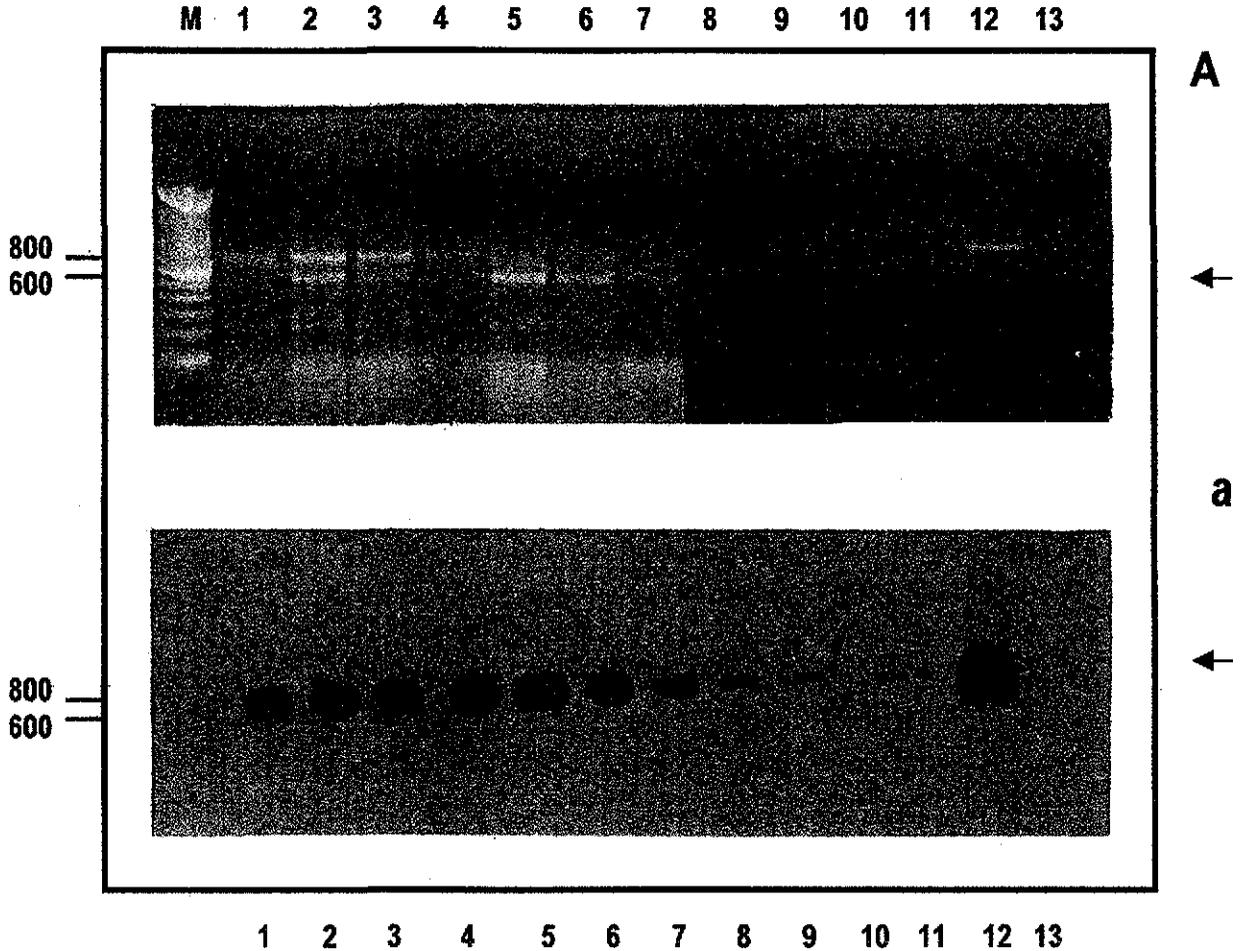


Fig. 11. Productos de amplificación obtenidos de diferentes concentraciones de DNA de larva (LM) de *T. spiralis* analizados con geles de agarosa al 1.5%. (11A). 500ng (línea 1), 300ng (línea 2), 200ng (línea 3), 100ng (línea 4), 50ng (línea 5), 30ng (línea 6), 12ng (línea 7), 2ng (línea 8), 500pg (línea 9), 100pg (línea 10) y 90pg (línea 11). Control positivo, 500ng de DNA obtenido de diafragma infectado con larva (LM) de *T. spiralis* (línea 12) y control negativo, 500ng de DNA de sangre de ratón (línea 13). Hibridación de productos de PCR con una sonda marcada con fluoresceína.(11a).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5. Análisis de productos de PCR obtenidos con diferentes número de larvas de *T.spiralis*.

Para determinar la sensibilidad del ensayo, se analizaron muestras de DNA obtenido a partir de 200 larvas hasta 1 larva y los productos de amplificación específicos de 600 y 800 pb se observaron desde 200 larvas hasta 20 larvas (LM). Se detectó la amplificación de un fragmento de 200 pb que se observó con claridad hasta con 20 larvas y que desapareció con un número menor a 10 larvas. El control positivo a partir de DNA de 500 larvas LM, hibridó los productos específicos esperados de 800 y 600 pb, mientras que no se observó hibridación en el control negativo (**Fig. 12A**).

6.6. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con diferente número de larvas de *T.spiralis*.

Para determinar la especificidad de los productos amplificados por PCR, se realizó un análisis por hibridación a los productos obtenidos por PCR con diferente número de larvas (LM) de *T.spiralis*. Los resultados obtenidos, detectaron a los fragmentos amplificados por PCR de 600 y 800 pb, pero también el fragmento de 200 pb que fue imperceptible a partir de 5 larvas (**Fig.12a**). Este resultado fue inesperado, debido a que en análisis anteriores el fragmento de 200 pb no había sido detectado por hibridación, lo que hacía suponer que era inespecífico.

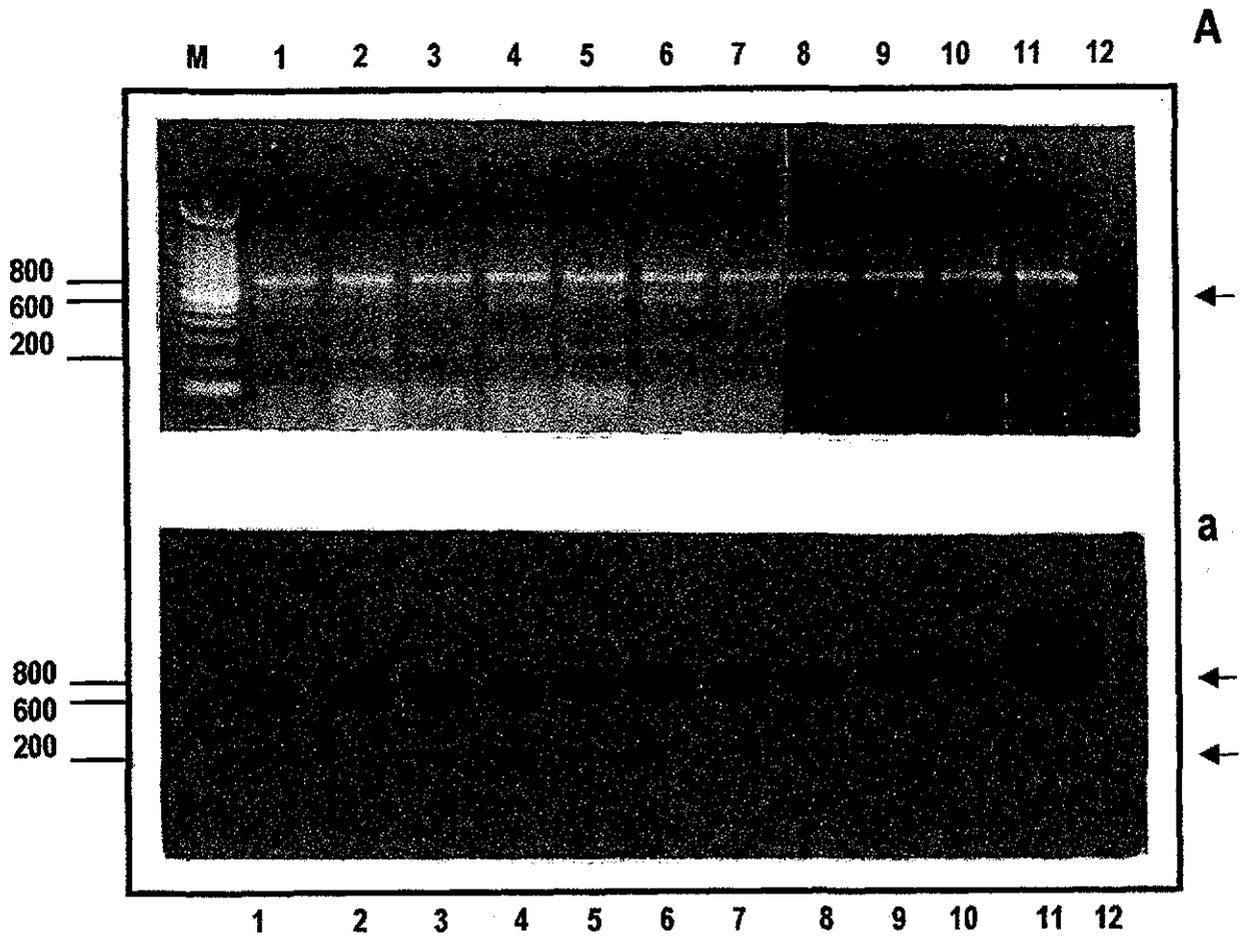


Fig. 12. Productos de amplificación obtenidos de DNA de diferente número de larvas (LM) de *T. spiralis* analizados con geles de agarosa al 1.5%. 200 larvas (**A**) (línea 1), 100 larvas (línea 2), 80 larvas (línea 3), 70 larvas (línea 4), 60 larvas (línea 5), 50ng (línea 6), 20 larvas (línea 7), 10 larvas (línea 8), 5 larvas (línea 9) y 1 larva (línea 10) 1. Control positivo DNA de 500 larvas LM (línea 11) y control negativo de DNA de sangre de ratón no infectado (línea 12). (**a**). Hibridación con sonda pPRA marcada con fluoresceína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.7. Análisis de productos de PCR obtenidos con DNA genómico de sangre de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis*.

La técnica de PCR pudo amplificar DNA de larva (LRN) *T. spiralis* en ratones infectados a partir del día 5 post-infección utilizando los iniciadores pPRA. Los productos de amplificación fueron de 600 y 800 pb. (Fig 13A). La toma de muestra de cada ratón se realizó hasta el día 35 post-infección y en este tiempo se detectó la amplificación de DNA del parásito hasta el día 17. En los siguientes días post-infección los fragmentos amplificados de DNA que se observaron en la fase temprana de infección, no se detectaron en la fase de invasión del parásito en el músculo de cada uno de los ratones analizados. (Fig 14B). Se usaron dos muestras de sangre como controles, una positiva procedente de la sangre de un ratón infectado experimentalmente con 500 larvas (LM) de *T. spiralis* y que se sacrificó en el día 8 post-infección para obtener adultos y larvas (LRN) del parásito y otra muestra negativa procedente de la sangre de un ratón no infectado. Los análisis por PCR amplificaron los fragmentos esperados de 600 y 800 pb en el control positivo y en el lote control no se amplificó DNA del parásito.

6.8. Análisis por hibridación de los productos de PCR obtenidos con DNA de sangre de ratones infectados y no infectados con *T. spiralis*.

Al realizar la transferencia de los geles de agarosa al 1% en membranas de Nylon, con una sonda pPRA, marcada con fluoresceína y revelada por quimioluminiscencia, se pudo detectar en el grupo de ratones infectados con *T. spiralis*, una amplificación entre 600 y 800 pb, que desapareció en el día 20 post-infección y volvió a aparecer en el día 35 post- inóculo. Se pudo observar que esta técnica fue mas

volvió a aparecer en el día 35 post- inóculo. Se pudo observar que esta técnica fue mas sensible que la PCR, que por este análisis no detectó nada en el día 35 post-infección (Figuras 13a y 14b).

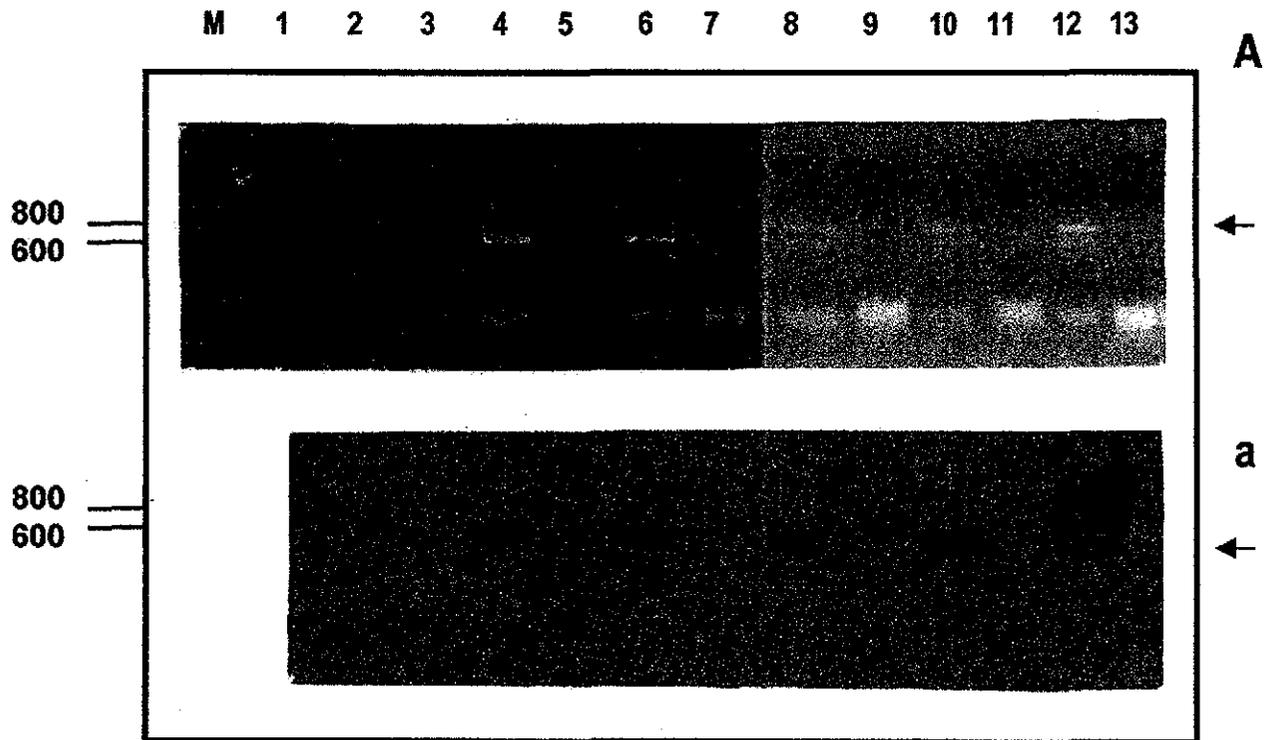


Fig. 13. Productos de amplificación obtenidos de DNA de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis* evaluados en los días 0-12 post-infección y analizados con geles de agarosa al 1.5%. (13A). Día cero (línea 1), día 3 (líneas 2-3), día 5 (líneas 4-5), día 7 (líneas 6-7), día 10 (líneas 8-9), día 12 (líneas 10-11). Control positivo, DNA de larva LM (línea 12) y control negativo, sangre de ratón sin infectar, ambos controles no incluidos en la cinética de infección (línea 13). Grupo experimental (líneas 2,4,6,8,10) y grupo control, ratones evaluados en el mismo tiempo que el grupo experimental (líneas 1,3,5,7,9) Hibridación de productos de PCR con sonda pPRA marcada con fluoresceína (13a).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

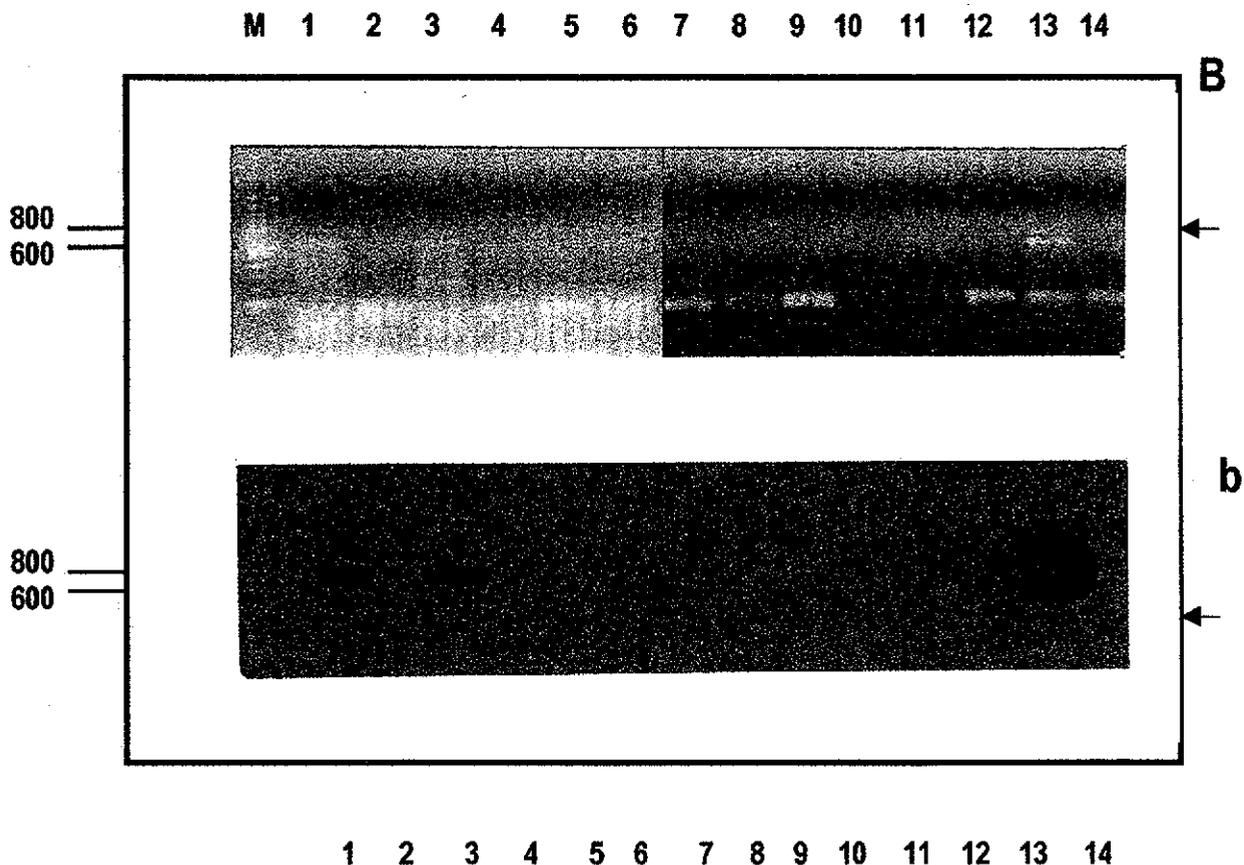


Fig. 14. Productos de amplificación obtenidos de DNA de ratones no infectados e infectados con *T. spiralis* evaluados en los días 15-35 post-infección y analizados con geles de agarosa al 1.5% (**14B**). Día 15 (líneas 1-2), día 17 (líneas 3-4), día 20 (líneas 5-6), día 22 (líneas 7-8), día 30 (líneas 9-10), Día 35 (líneas 11-12). Control positivo DNA de larva LM (línea 13) y control negativo sangre de ratón sin infectar (línea 14), ambos controles no incluidos en la cinética de infección. Grupo experimental (líneas 1,3,5,7,9,11) y grupo control, ratones evaluados en el mismo tiempo que el grupo experimental (líneas 2,4,6,8,10). (**14b**), Hibridación de productos de PCR con sonda pPRA marcada con fluoresceína.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. DISCUSION

La triquinelosis es una de las parasitosis de difícil diagnóstico tanto en la fase temprana como crónica de la infección, siendo esta la causa principal por la que los datos epidemiológicos son imprecisos de la incidencia y prevalencia de la parasitosis en humanos. Los métodos que se han utilizado para su diagnóstico, detectan la presencia del parásito cuando éste se encuentra dentro del músculo, es decir, durante la fase tardía de la infección y en esta fase, hay una sintomatología clínica severa en el humano y un problema de salud latente porque el tratamiento con fármacos se dificulta, ya que pocos alcanzan concentraciones óptimas en el plasma. El principal mecanismo de transmisión de la triquinelosis al humano es el consumo de carne de animales infectados con el parásito como el cerdo y el caballo y los métodos parasitológicos empleados hasta ahora para el diagnóstico de *T. spiralis* en animales domésticos para el consumo humano tienen 2 dos principales desventajas: 1) poca sensibilidad, y 2) no detectar al parásito en la etapa inicial de la infección. Los análisis parasitológicos de rutina para el diagnóstico de la triquinelosis en los animales de rastro, como la triquinoscopia y digestión artificial, son los métodos más utilizados por ser baratos y de fácil uso, pero con la gran desventaja de ser poco sensibles¹⁰³, que pueden provenir de animales con carga parasitaria baja, y dar como resultado reacciones falsos negativos. A este respecto, Vignau, et al (1999)¹⁰⁶ compararon los dos métodos diagnósticos y mencionaron que la sensibilidad de estas técnicas está asociada a errores en su aplicación, ya que hay muchas posibilidades de escoger de toda una canal de carne, solo un fragmento y no varios escogidos aleatoriamente, aunado a el poco conocimiento de la morfología del parásito de quienes revisan la carne y que puede ser motivo de

inadvertir la presencia de *T. spiralis*. En casos humanos, la biopsia representa el método directo utilizado en México. El diagnóstico de la mayoría de casos es respaldado por estudios clínicos que permite identificar al parásito ^{79,80}, pero se considera que una biopsia es un procedimiento doloroso y que en infecciones con carga parasitaria baja, puede resultar negativa.

Otro método diagnóstico son los exámenes clínicos y pruebas paraclínicas (determinación cuantitativa de eosinófilos circulantes, niveles de enzimas séricas, etc) así como el electrocardiograma, sin embargo también se considera que no son pruebas confirmatorias exclusivas de la triquinelosis por lo que no se pueden aplicar como medios de diagnóstico único de esta parasitosis²⁴. Con respecto a las técnicas serológicas, éstas representan una buena opción en el diagnóstico de la triquinelosis, principalmente la prueba de ELISA y Western blot ^{133,134}, sin embargo Morakote, et al (1991), reportó que los resultados en especificidad y sensibilidad de la prueba de ELISA, está relacionada a la calidad de los antígenos que se utilizan¹³⁵. Esta observación es importante, debido a que si no se cuenta con un buen antígeno, la calidad de la prueba y por lo tanto de su resultado final, favorecería las reacciones cruzadas o inespecíficas, así como también es importante considerar que en casos humanos la producción de anticuerpos anti- *T. spiralis* se lleva a cabo después de 2 a 3 semanas de infección⁷ lo que excluye a estas técnicas para un diagnóstico en la fase temprana de infección.

Considerando estos antecedentes, se revisaron los trabajos relacionados al uso de la PCR como técnica diagnóstica en diferentes organismos, en ellos se encontró que el análisis para la detección de DNA se realizó con buenos resultados desde virus hasta parásitos^{137,138,139,140}. Entre las ventajas que apoyan el uso de este método de

diagnóstico, están: su alta sensibilidad, especificidad y la capacidad de analizar en el mismo tiempo un mayor número de muestras.

Diferentes trabajos demostraron la amplificación de DNA de *T. spiralis* a partir de músculo infectado y larvas (LM) que se obtuvieron del mismo tejido^{146,147,148}, el objetivo siguiente fue amplificar fragmentos de DNA en una fase del parásito que se encuentra circulando en la sangre de los mamíferos infectados y que corresponde a la fase temprana de infección.

Basados en la hipótesis de que la PCR puede amplificar secuencias determinadas de *T. spiralis* en músculo, este trabajo buscó como objetivo utilizar esta técnica en sangre de ratones infectados con el parásito y determinar su utilidad en periodos tempranos de infección. Se determinó el inóculo adecuado para infectar grupos de ratones con *T. spiralis*. La infección con 700 y 500 larvas mostró una mortalidad de 27 a 47% comparativamente a la infección con 100 larvas, en donde todos los animales sobrevivieron pero en 4 de 15 ratones analizados no se detectaron adultos, ni larva (LM) del parásito en intestino y músculo esquelético respectivamente, lo que indicó que este inóculo no fue el adecuado para infectar a los animales. Con el inóculo de 300 larvas se mostró un 93 % de sobrevivencia, pero se encontraron gusanos adultos en el intestino y larvas en el músculo esquelético. (**Fig. 7,8 ,9**). De acuerdo a los resultados evaluados se consideró que el inóculo de 300 larvas (LM) fue el adecuado para infectar a los ratones a partir de los cuales se tomaron las muestras de sangre para su posterior análisis por PCR. Cabe hacer notar que se incluyó un grupo de animales como control negativo sin infectar para comparar con el grupo experimental infectado con *T. spiralis*. Se realizó el método de extracción de DNA de la sangre de ratones BALB/c infectados con *T. spiralis* y no infectados. Se obtuvo DNA de alto peso molecular sin signos de

degradación, lo que determinó que el método de extracción de DNA genómico fue adecuado (**Fig 10**).

Consideramos importante demostrar la sensibilidad de la técnica de la PCR, tomando en cuenta las concentraciones de material genético y el número mínimo de parásitos, para obtener resultados que permitieran validar el método como forma de diagnóstico. Un trabajo previo, realizado por Dupouy- Camet et al (1991)¹⁴⁶, demostró la sensibilidad de la PCR, al detectar 200 y 2 ng de DNA, correspondiente a 2 y 0.02 larvas de *T. spiralis* respectivamente. En el presente trabajo, consideramos evaluar la sensibilidad de la PCR con concentraciones desde 500 ng hasta 90 pg del DNA de larvas (LM), disminuyendo los valores hasta picogramos (pg) respecto al trabajo anteriormente mencionado¹⁵⁵. Se observó la amplificación de los fragmentos de 800, 600 y de 200 pb en una concentración mínima de 500 pg de DNA *T. spiralis* (**Fig. 11A**). Al realizar la hibridación de los fragmentos amplificados por PCR con la sonda pPRA marcada con fluoresceína, se observó un reconocimiento a los 2 fragmentos de 800 y 600 pb, pero no así al de 200 pb, en una concentración mínima de 100 pg de DNA del parásito (**Fig.11a**).

También se analizó la cantidad mínima de parásitos que las técnicas de estudio antes mencionadas pueden detectar y para ello se evaluó la amplificación de fragmentos de DNA en 200 hasta 1 larva (LM) de *T. spiralis*. Los resultados obtenidos de este análisis demostraron nuevamente, la amplificación por PCR de los fragmentos de 800, 600 y 200 pb (**Fig. 12A**), pero a partir de 10 larvas se observó con mas claridad el fragmento de 800 pb. Los resultados que por hibridación se obtuvieron fueron inesperados, debido a que la sonda pPRA hibridó además de los fragmentos de 800 y 600 pb, al fragmento de 200 pb, que anteriormente no se había detectado. (**Fig.12a**). Estos resultados,

difieren a lo reportado por Dupouy-Camet et al (1991)¹⁴⁶, quienes observaron con mayor claridad el fragmento de 600 pb correspondiente al DNA de 0.02 larvas. La explicación de estas diferencias, puede deberse a la existencia de una variante de 1.9 kb de la secuencia repetida de DNA de 1.7 kb de acuerdo a la secuencia de DNA de *T. spiralis* reportada por DeVos et al (1988)¹⁴⁵.

Se evaluó, la amplificación por PCR de la secuencia de interés en sangre de ratones BALB/c infectados con *T. spiralis*, utilizando el fragmento pPRA mediante una cinética de infección. Los resultados mostraron la amplificación de los productos de 600 y 800 pb en DNA obtenido de sangre de ratones infectados experimentalmente. Estos productos de amplificación se detectaron a partir del tercer día y hasta el día 17 post-infección. En la sangre del grupo control no se observó ninguna amplificación, lo que confirma que el resultado positivo que se encontró fue estimulado por la presencia del parásito en la sangre de los animales del grupo experimental (**Figs. 13 y 14**).

La técnica de hibridación con la sonda pPRA con la secuencia complementaria al DNA blanco, confirmó la especificidad de los productos amplificados por PCR en los mismos días analizados por PCR y es importante destacar que por esta técnica se detectó la presencia de DNA del parásito en el día 3 post-infección que por PCR no se detectó con claridad (**Fig. 13a**).

Los resultados obtenidos en este estudio, difieren de los trabajos realizados por Soulé et al (1993)¹⁴⁹ y Uparanukraw y Morakote (1997)¹⁵¹ quienes utilizaron la PCR con los iniciadores pPRA en sangre de caballos y de ratones respectivamente y observaron los mismos fragmentos de DNA amplificados, a partir del día 5 post-infección. Estas diferencias se pueden atribuir a la carga parasitaria que se utilizó para la infección de los animales, ellos utilizaron hasta 350 larvas y en este trabajo se utilizó un inóculo de

solo 300 larvas; puede pensarse que esta diferencia no sea relevante, pero los mismos autores hicieron hincapié en que es importante considerar los errores no controlados en la cuenta de parásitos para el inóculo, procesamiento de la muestra biológica y obtención de DNA que pueden ser la causa de estas pequeñas diferencias, sin embargo nuestros resultados confirmados por hibridación, permiten sugerir que la detección de DNA puede realizarse a partir del día 3 post-infección porque la liberación de las larvas recién nacidas comienza a partir de 30 horas de iniciada la infección en humanos^{1,6} y aunque el presente trabajo se realizó con un modelo murino, las observaciones que realizamos en el intestino de los ratones infectados, detectó la presencia de adultos y larvas recién nacidas a partir del día 3 post-infección.

Este trabajo confirmó lo realizado por Soulé et al (1993)¹⁴⁹ y Uparanukraw y Morakote (1997)¹⁵¹, aunque nosotros, observamos amplificación de DNA del parásito hasta el día 17 post-infección, que fue diferente a los resultados obtenidos por Uparanukraw y Morakote (1997)¹⁵¹ quienes encontraron DNA del parásito hasta el día 14 post-infección. Las variantes que se observaron en este trabajo y la de otros autores¹⁵¹ fueron las esperadas, debido a que de acuerdo con el ciclo de vida del parásito, entre los 14 y 20 días de infección, *T. spiralis* comienza a desaparecer de circulación sanguínea^{1,7,17,18,19}. Este dato pudimos confirmarlo, con los análisis al microscopio que se realizaron en gusanos adultos, larva recién nacida y larva muscular obtenidos de ratones infectados con *T. spiralis* a diferentes días post-infección (**Figs. 8 y 9**), así como en los análisis realizados por PCR e hibridación, en donde no se detectó amplificación de los fragmentos esperados, correspondientes al DNA del parásito a partir del día 20 y hasta el día 35 post-infección (**Figs. 14 A y 14 a**).

Con los resultados anteriormente expuestos, se demostró que las técnicas que se usaron para detectar una infección experimental de triquinosis permitieron detectar cantidades mínimas de DNA hasta en una larva de *T. spiralis*. Si se considera poner en práctica las técnicas de diagnóstico que se usaron en este trabajo, su utilidad sería una buena opción para determinar la fase temprana y tardía en posibles infecciones por *T. spiralis* en animales como el cerdo y actualmente el caballo, provenientes de rastros que surten carne para consumo humano.

Se demostró que el método de hibridación fue más sensible y permitió reconocer secuencias complementarias al DNA blanco que por PCR no se visualizaron con claridad. Por tal motivo se sugiere utilizar las técnicas de PCR e hibridación en conjunto para descartar amplificaciones inespecíficas y detectar fragmentos de interés con concentraciones bajas de DNA.

La técnica de PCR detectó la presencia de DNA de *T. spiralis* en la etapa temprana de infección y confirmó lo previamente realizado por otros autores^{158,160}, lo que abre perspectivas hacia otras investigaciones relacionadas con la aplicación de la técnica en casos humanos. Es importante mencionar que para proponer a la PCR como técnica de la que se puedan obtener los mismos resultados en humanos de los que se obtuvieron con muestras de tejido sanguíneo y muscular de animales en fase experimental se requiere tener mucho cuidado. Un análisis por PCR en sangre de pacientes infectados y con antecedentes de haber ingerido carne de caballo infectada con *T. spiralis* realizado por Robert et al (1996)¹⁵⁰, mostró porcentajes bajos de casos positivos y consideraron a la técnica con un valor diagnóstico limitado. A este respecto nosotros consideramos la siguiente observación: el origen de los iniciadores puede ser la causa principal que limite la detección de más casos, debido a que en el anterior trabajo, se utilizaron los

iniciadores pPRA¹⁴⁸, mismos que usamos en este trabajo y cuyo origen es a partir de una cepa tipo cerdo que corresponde a un ciclo tipo doméstico⁹. Aunque se comprobó que estos iniciadores son exclusivos de *T. spiralis*¹⁴⁸ es importante considerar que con estos iniciadores no se detectaron infecciones crónicas en caballos. Esto puede significar que en un grupo de personas infectadas con *T. spiralis*, el origen de la cepa con la que se infectaron no siempre sea tipo cerdo y aunque los iniciadores pPra están bien documentados para amplificar DNA exclusivo de *T. spiralis* y no de otra especie de *Trichinella*^{148,149,150,151}, puede suceder que el DNA de una cepa de *T. spiralis* tipo caballo no sea reconocida por los iniciadores pPra. En este tema se propone investigar nuevos iniciadores específicos que tengan su origen en cepas de *T. spiralis* tipo caballos, debido a la actual problemática de considerar a este hervívoro doméstico como fuente de infección para el humano^{10,11}, así como en otros animales con un ciclo de tipo silvestre, con el fin de descartar reacciones falso negativas. Otra observación que deberá de considerarse son las manifestaciones clínicas que se presentan durante la fase temprana de infección; como se mencionó, esta sintomatología puede confundirse con otros padecimientos de origen infeccioso distinto a *T. spiralis* y es común que una infección por este parásito en la fase temprana pueda pasar desapercibida. Por lo tanto se propone que en una infección gastrointestinal donde existan manifestaciones clínicas como: diarrea, fiebre, nauseas, vómito y cefalea, se considere una posible infección por *T. spiralis* y se analice la sangre de ese paciente por la técnica de PCR.

Finalmente, es necesario discutir, que aunque la PCR es una técnica que en diversos trabajos, incluido el presente, es una buena opción para el diagnóstico de la triquinelosis, hay que considerar que por el momento no es un método accesible para

cualquier laboratorio de rutina, sin embargo se deben de tomar en cuenta las posibilidades de esta técnica de diagnóstico, para aplicarla a gran escala en estudios de medicina humana y veterinaria.

8. CONCLUSIONES

1. La técnica de PCR detectó la presencia de DNA de *Trichinella spiralis* en etapas tempranas de la infección en sangre de ratones experimentalmente infectados cuando se utilizó DNA de sangre de ratones infectados con *T. spiralis* tomados a diferentes días después de la infección.

2. Se observó una amplificación de 2 productos de 600 y 800 pares de bases, a partir del día 3 hasta el día 17 post-infección. El control negativo no amplificó nada en los mismos días.

3. La sensibilidad de la PCR fue de 500 pg de DNA y se detectó DNA de una sola larva del parásito.

4. La técnica de hibridación fue más sensible porque detectó hasta 100 pg, por lo que es importante realizar las dos técnicas en conjunto para determinar un mejor resultado.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Beaver, Ch, P., Jung, C.R. and Cupp, W.E. Parasitología Clínica 2 ed. Salvat, México.,1986.
2. Kim, C.W. Epidemiology II. Geografic distribution and prevalencia: In Campbell W.C. *Trichinella* and Trichinosis. Pleum, New York. 1983., pp:445-500.
3. Despommier, D. D. *Trichinella spiralis*: The Worm that would be virus. Parasitology Today. 1990., 6: 193-196.
4. Owen, R. Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of the human body. Transsactions of the Zoological Society (London). 1835., 1: 315- 324.
5. Lombardero, J. O. Los nombres científicos de los parásitos y su explicación. Departamento de Extensión Universitaria y Aplicación de Estudios. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 1967., 77 pp.
6. Faust, C.E., Russell, F.P. y Lincione, D.R. Parasitología Clínica de Craig y Faust. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, México., 1961. 1056 pp.
7. Despommier, D.D., Gwadz, R.W. and Hotez, P.J. Parasitic Diseases. 3 ed. Springer- Verlag, New York. 1994., pp: 32- 39.
8. Anderson, R.C., Chabaud, A.G.. and Willmot, S. 1974-83. C.I.H. Keys to the nematode parasites of vertebrates. Nums: 1-10. Common Wealth Agriculture Bureaux, FRNAham Royal, Bucks, UK.
9. Campbell, W.C. Trichinosis revisted, another look at modes of transmission. Parasitology Today. 1988., 113: 527- 533.
10. Arriaga, C., Yepez- Mulia, L., Viveros, N., Adame, L.A., Zarlenga, D.S., Lichtenfels, J.R., Benitez, E. and Ortega- Pierres, M.G. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. Journal of Parasitology. 1995., 81: 781- 783.
11. Pozio, E., Tamburrini, A., Sacchi, L., Gómez-Morales, M.A., Corona, S., Goffredo, E, and La Rosa, G. Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. Internatinal Journal for Parasitology. 1997., 27: 1613-1621.
12. Cruz-Reyes, A. y Camargo, C.B. Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. Plaza y Valdes. México. 2001., pp: 199.
13. Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K.D. and Lichtenfels, J.R. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. Journal of Parasitology. 1992., 78: 654-659.

-
14. Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I. And Takahashi, V. Expression of MyOD and myogenin in muscles of mice experimentally infected with *Trichinella spiralis* of *Trichinella pseudospiralis*. Parasite., 2001, 8: S51-S53.
15. Pozio, E., La Rosa, G. and Rossi, P. *Trichinella* Reference Centre. Parasitology Today. 1989., 5: 169-170.
16. Von Köler, J., Kapel, C.M.O., Enemark, H.L. and Hindsbo, O. Infectivity of *Trichinella* spp. Recorevered from decaying mouse and fox muscle tissue. Parasite. 2001., 8: S209-S212.
17. Gamble, H.R. Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. Journal of Food Protection. 1996., 59: 295-298.
18. Moretti, A., Piergili-Fioretti, D., Grelloni, V., Marini, C., Leonardi, L. and Velatta, F. Susceptibility of nutria (*Myocastor coypus*) to *Trichinella* infection: Biological aspects. Parasite. 2001., 8: S206- S208.
19. Malakauskas, A., Kopel, C.M.O. and Webster, P. Infectivity and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. Parasite. 2001., 8: S216- S222.
20. Martínez-Fernández, A.R., Arribas, B. And Bolas, F. Freezing resistanse *Trichinella* isolates (*T. spiralis* and *T. britovi*. In: Ortega- Pierres, G., Gamble, R., van Knapen, F. and Wakelin, D (ed). Trichinellosis. Centro de Investigacion y estudios Avanzados del IPN. México. 1998., pp: 99-103.
21. Pozio, E., La Rosa, G., Rossi, P. And Murrell, K.D. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. Journal of Parasitology. 1992., 78: 647-653.
22. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O. Foodborne diseases handbook caused by viruses, parasites and fungi. Vol. 2. Marcel Dekker, Inc. New York. 1994., pp: 255-277.
23. Wassom, D.L., Dougherty, D.A. and Dick, T.A. *Trichinella spiralis* infections of inbred mice: immunological specific responses indaced by different *Trichinella* isolates, Journal of Parasitology. 1988., 74: 283-287.
24. Ortega, P.M.G., Yopez, M.L., Haman, W., Gamble, H.R., Lim, P.L., Takahashi, Y., Wassom, D. L. and Appeton, J.A. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a plataform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. Parasite Immunology. 1996., 18: 273-284.
25. Takahashi, Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitology Today. 1997., 13: 104-106.

-
26. Brushi, F., Moretti, A., Wassom, D. and Piergili, F.D. The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite*. 2001., 8: S141-S143.
27. García-Rodríguez, J.J., Torrado, J. and Bolas, F. Improving bioavailability and antihelmintic activity of albendazole by preparing albendazole. Cyclodextrin complex. *Parasite*. 2001., 8: S195- S198.
28. Chung, M.S., Joo, K.H., Quan, F.S., Know, H.S. and Cho, S.W. Efficacy of flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. 2001., 8: S195- S198.
29. Yopez-Mulia, Morales-Hurtado, R., Viveros-Guzmán, N., Cedillo-Rivera, R., Hernández, L. F., Castillo, R., Hernández-Campos, A. And Muñoz, O. Evaluation of albendazole prodrugs in experimental trichinellosis. *Archives of Medical Research*. 1999., 30: 368-374.
30. La Rosa, G., Pozio, E., Rossi, P. and Murelli, K.D. Alloenzyme analysis of *Trichinella* isolates from host species and geographical region. *Journal of Parasitology*. 1992., 78: 641-646.
31. Bandi, C., La Rosa, G., Comincini, S., Damiani, G. and Pozio, E. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*. 1993., 107: 419- 424.
32. Wu, Z., Nagano, I., Pozio, E. and Takahashi, Y. Polymerase Chain Reaction-restricción fragment length polymorphism (PCR- RFLP) for identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology*. 1999., 118: 211- 218.
33. Soule, C., Guillou, J.P., Dupouy- Camet, J., Vallet, C. and Pozio, E. Diferentiation of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*. 1993., 79: 461- 465.
34. Wu, Z., Nagano, I. And Takahasi, Y. The detection of *Trichinella* with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glicoproteins. *Parasitology*. 1998., 117: 173-183.
35. Yao, Ch., Prestwood, A.K. and McGraw, A.R. *Trichinella spiralis* (T1) and *Trichinella* T5: A comparasion using animal infectivity and molecular biology techniques. *Journal of Parasitology* 1997., 83: 88- 95.
36. Appleyand, G.D., Zarlenga, D., Pozio, E. and Gajadhar, A.A. Diferentiation of *Trichinella* genotypes by Polymerase Chain Reaction using sequence- specific primers. *Journal of Parasitology*. 1999., 85: 556-559.

-
37. Zarlenga, D.Z., Fadwa, A.Y., Minchella, D.J. and La Rosa, G. A repetitive DNA probe specific for a North America sylvatic genotype of *Trichinella*. *Molecular Biochemical Parasitology*. 1991., 48: 131-138.
38. Mutafova, T., Dimitrova, Y. and Komandarev, S. The karyotype of four *Trichinella* species. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 1982., 67: 115-120.
39. Pozio, E. and La Rosa, G. *Trichinella murrelli* n.sp.: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *Journal of Parasitology*. 2000., 86: 134-139.
40. Pozio, E., Owen, I.L., La Rosa, G., Sachi, L., Rossi, P., Corona, S. *Trichinella papuae* n.sp. (Nematoda), a new non encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Journal of Parasitology*. 1999., 29: 1825-1839.
41. Bandi, C., La Rosa, G., Bardin, M.G., Damiani, G., Comincini, S., Tasciotti, L. And Pozio, E. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with alloenzyme analysis. *Parasitology*. 1995., 110: 401-407.
42. Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E. And Takahashi, Y. Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene. *International Journal of Parasitology*. 1999., 29: 1113-1120.
43. Murrell, K.D., Lichtenfels, R.J., Zarlenga, D.S. and Pozio, E. The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Veterinary Parasitology*. 2000., 93: 293-307.
44. Kosek, W.J. *Trichinella spiralis*: Morphological characteristics of male and female-infecting larvae. *Experimental Parasitology*. 1975., 37: 380-387.
45. Barush, V., Tenora, F., Wiger, R., Genov, T. and Kamanderev, S. Scanning electron microscopy studies on males of *Trichinella* species. *Folia Parasitologica (PRAHA)*. 1979., 26: 97-101.
46. Polvere, R. I., Kabbash, C.A., Capó, V.A., Kadan, I. And Despommier, D.D. *Trichinella spiralis*: Synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Experimental Parasitology*. 1997., 86: 191-199.
47. Despommier, D. D. How does *Trichinella spiralis* make it self at home?. *Parasitology Today*. 1998., 14: 318-323.
48. Lapage, G. *Parasitología Veterinaria*. C E C S A, México. 1968., pp: 173-177.
49. Brown, W.H. and Neva, F.A. *Parasitología clínica*. 4 ed. Interamericana. México, D.F, 1985., 360 pp.

50. Noble, E.R., Noble, G.A., Shad, G.A. and Maclanes, A.J. Parasitology. The biology of animal parasites, 6 ed. Lea and Febier. USA. 1989., pp: 344-349.

51. Wright, K.A. *Trichinella spiralis*: an intracelular parasite in the intestinal phase. Journal of Parasitology. 1979., 65: 441- 445.

52. Schantz, P.M. Trichinosis in the United States. 1947- 1981. Food Technology. 1983., March: 83-86.

53. Centers for Disease Control. Trichinosis Surveillane. Annual Summary. 1980., Atlanta, U.S.A. Departament of Health and Human Services. 1981. 36: 1-5.

54. Moorhead, A., Graunenwald, P.E., Dietz, V.J. and Schantz, P. Trichinellosis in the United States, 1991.1996: Declining but not gone. American Journal Tropical Medicine and Hygine. 1999., 60: 66- 69.

55. Smith, N., Saville, J.M., Greenway, J.A., Stovell, P.L. and Hole, L. Sylvatic trichinosis in British Columbia. Public Healt Report. 1978., 93: 189-193.

56. Eaton, R.P.D. Trichinosis in the artic. Canadian Medicus Association Journal 1979., 120: 22.

57. Schenone, H., Kagan, G.I., Knierim, F., Marticorena, S., Schürch, A. y Carrasco, J. Epidemia de triquinosis en Temuco. Boletín Chileno de Parasitología. 1972., 27: 33-36.

58. Acha, P.N. and Szyfres, B. Zoonoses and comunicable diseases comun to man and animals. PAHO Scientific Publication No. 354. 1980., 549 pp.

59. Ortega-Pierres, M.G., Arriaga, C. and Yépez-Mulia, L. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. Veterinary Parasitology. 2000., 93: 201-225.

60. Pozio, E. Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, ecology and economic impact. Parasitology Today. 1998., 14: 35- 38.

61. Ramírez, F.B. La triquina. Instituto de Medicina Nacional. 4: 1893., 147-148.

62. Barragán, J.. La triquina en México. Tesis. Fac. Nac. de Medicina, México., 1893.

63. Olvera, J. Triquinosis en México, Contribución de dos casos para la historia de la triquinosis en la capital. Gaceta Medica de México. 1896., 33: 167-175.

64. Perrin, T. Primeras observaciones sobre la frecuencia en México de triquinosis ignoradas. Revista Medica del Hospital General. 1939., 1: 437-445.

65. Mazzotti, L y Chavira, C. Investigación de triquina en 600 diafragmas humanos de la Ciudad de México. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, 1943., 4: 343-351.

66. Mazzotti, L y Pastrana, H. La investigación de triquinosis en tejidos musculares por el método de digestión. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. 1943., 4: 337-342

67. Perrin, T. Algunos estudios sobre triquinosis ignoradas. Ciencia. 1942., 3: 108-114.

68. Mazzotti, L. y Lozano, H.E. La prueba intracutánea de Bachman para el diagnóstico de la triquinosis en 1000 personas sanas de la Ciudad de México. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. 1944., 5: 31-35.

69. González, C.A., Martínez-Marañón, R., Dávalos, M.A. y Curiel, H.R. Investigación de una probable epidemia de triquinosis. Boletín Informativo de la Dirección General de Investigación en Salud Pública (México). 1975., 4: 139-199.

70. Cabrera, T. N. Encuesta serológica de la triquinosis en el Estado de Chiapas, México, utilizando la fluculación con bentonita como prueba. Tesis. Prof. Fac. de Ciencias, UNAM. México. 1977., 41 pp.

71. Martínez-Marañón, R. Un pequeño brote familiar de triquinosis en Naucalpan, México. Salud Pública de México. 1979., 21: 161-165.

72. Martínez- Marañón, R., Ruíz, F. A., Rojas, C. F., Cortés, C. A., Escobar, L.M. y Díaz, C.G. Triquinosis en Zacatecas. Estudio epidemiológico y clínico. Prensa Médica de México. 1979., 44: 278- 287.

73. Díaz, S.J., Manjarrez, M.A., Gómez, B.J., González, A.J. y Velez de la Rosa, H. Triquinosis reporte de un brote familiar. Residente. 1979., 4: 326-328.

74. Fragoso, U. R. Un brote de triquinosis en Villanueva, Zacatecas. Salud Pública de México. 1981., 23: 25-41.

75. Martínez- Marañón, R. Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. Salud Pública de México. 1983., 25: 574-578.

76. Villacaña, F.H., Escobar, L.M., Díaz, C.G. y Díaz, A. Nuevos brotes de triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública de México. 1984., 26: 260-262.

77. Martínez- Marañón, R., Escobar, L. M., Bañuelos, R.J. M. y Díaz, C.G. Otro brote de triquinosis en la ciudad de Zacatecas y observaciones de eosinofilia de esta enfermedad. Salud Pública de México. 1985., 27: 174- 179.

78. Rocha, Ch. E., Avitia, A.L. y Sánchez, A.L.F. Diagnóstico retrospectivo de un brote de triquinosis en el estado de Durango. *Salud Pública de México*. 1986., 28: 367-370.

79. Martínez-Pantaleón, O.B., Viguera-Rendón, A., Carvajal, G.A.M., Pérez, F.A. y Abrahám-Jalil, A. 1986. Triquinosis. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1986. 43: 181-183.

80. Sarti, G.E.J., Gutiérrez, O.I. y Koopman, S.J. Brote de triquinosis ocurrido en una oficina de gobierno. *México, D.F.* 1985., 28. 41- 47.

81. Saltiageral, S.P., González, S.N., Hernández, P.M. y Briones, L.E. Triquinosis en pediatría. Presentación de 4 casos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 1989., 2: 63- 65.

82. Rojas, O.S., Reyes, G.E. y Ponce de León, R.S. Triquinosis esporádica. *Salud Pública de México*. 1989., 31: 658-663.

83. Cabral- Soto, J., Villacaña- Fuentes, H., Fragosó- Uribe, R. Y Contreras, A. Perfil epidemiológico de la triquinosis en Zacatecas. *Salud Pública de México*. 1990., 32: 575-582.

84. Zamora - Chávez, A., de la O - Cavazos, M.E., Bernal - Redondo, R.M., Berrones - Espericueta, D. y Vázquez- Antona, C. Triquinosis aguda en niños. Brote epidémico intrafamiliar en la ciudad de México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1990., 47: 395- 400.

85. Álvarez- Chacón, R., Riega Carnero, R. E., García-Rosales, J.J., Wong- Chio, M. y Cob Sosa, C.E. Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 1992., 49: 286-290.

86. Martínez, B.I., Gutiérrez, Q.M., Romero, C.R., Fernández, P.A.M., Vázquez, T O., Pérez, L.M.J. y Gutiérrez, C.E.M. Inmunoepidemiología de la triquinelosis en niños de la ciudad de México. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 2000., 47: 156-161.

87. Nuñez, M. C. y Mazzotti, L. Incidencia de triquinosis en gatos de la ciudad de México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 1948., 9: 51-54.

88. Mazzotti, L., Alcántara, O. Incidencia de *Trichinella spiralis* en 900 ratas (*Rattus norvegicus*) en la ciudad de México, D.F. *Revista de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. 1954., 14: 201-202.

89. Despommier, D.D., Weisbroth, S. and Frass, C. Circulating eosinophils and trichinosis in the rat: the responsible for induction during infection. *Journal of Parasitology*. 1974., 60: 280- 284.

-
90. Cheng, T. C. General Parasitology. 2ed. Academic Press. Florida, USA. 1986., 489- 492 pp.
91. Beaver, P. Ch. and Jung, R. C. Animal Agents and Vectors of Human Disease 5 ed. Philadelphia, USA. 1985., pp:129- 133
92. Jasmer, D. P., Bohnet, S. and Prieur, D. J. *Trichinella* spp: diferencial expression of acid phosphatase and myofibrillar proteins in infected muscle cells. Experimental Parasitology. 1991., 72: 321- 331.
93. Stewart, G.L. and Read, C. P. Studies on biochemical pathology in trichinosis I. Changes in myoglobin, free creatine, phosphocreatine and two protein fractions of mouse diaphragm muscle. Journal of Parasitology. 1974., 60: 996-1000.
94. Stewart, G. L. and Giannini, S. H. *Sarcocystis*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Brugia*, *Ancylostoma* and *Trichinella* spp: a review of the intracellular parasites of stretch muscle. Experimental Parasitology. 1982., 53: 406- 447.
95. Wakelin, D. and Denham, D. A. The immune response. In *Trichinella* and Trichinosis. Campell, W.C. Plenum Press, New York. 1983., pp 265- 303.
96. Philipp, M., Porkhouse, R. M. E. and Ogilvie, B. M. Molecular basis for stage specific of primary antibody responses to the surface of *Trichinella spiralis*. In Trichinellosis. Proceeding of the 5th. International Conference on Trichinellosis. Kim, C.W., Ruienburg, E.J. and Teppema, J.S., Reedbooks, Chertsey, Surrey 1981., pp 59- 64.
97. Wakelin, D. and Grecis, R.K. T- cell and genetic control of inflammatory cells. In Allergy and Immunity to the Helminths: Common Mechanisms or Divergent Pathways. Tylor and Francis, London. 1992., pp 107-136.
98. Harwood, C. L., Young, I. S., Lee, D.L. and Altrinham, D. The effect of *Trichinella spiralis* infection on the mechanical properties of the mammalian diaphragm. Parasitology. 1996., 113: 535- 543.
99. Powloski, Z.S. Trichinosis. In Current diagnosis. 7 ed. Conn, R.B. ed. W.B. Saunders. Philadelphia. 1985., pp 297- 300.
100. Casali, A.J. and Costa, E.A. Investigación clínica y anatomopatológica del tratamiento de la triquinelosis aguda con tiabendazol. Boletín Chileno de Parasitología. 1997., 32: 66-70.
101. Kociecka, E. Trichinellosis: human disease. Diagnosis and treatment. Veterinary Parasitology. 2000., 365-383.
102. Atias, A. Parasitología Médica. Publicaciones Técnicas Mediterraneo Santiago de Chile. pp 320-324.

103. Prost, E. Effectiveness of trichinoscopic examination in abattoirs. *Wiadomosci Parazytol.* 1959., 5 :297.

104. Van Knappen, F., Franchimont, J.H., Ruitenbergh, E.J., Baldelli, B., Bradley, J., Gibson, T.E., Gottal, C., Henriksen, S.A., Köhler, G., Skovgaard, N., Soulé, C. and Taylor, S.M. Comparison of the enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA) with three methods for the detection of *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Veterinary Parasitology.* 1980., 7: 109 -121.

105. Soulé, C. and Dupouy-Camet, J. La Trichinellose: une zoonose en évolution. OIE, 1991. Paris. 292 pp.

106. Vignau, M.L., del Valle, G.M., Atilio, R.M. and Eiras, D.F. Comparison between two methods for diagnosis of trichinellosis: trichinoscopy and artificial digestion. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro 1997., 92: 585-587.

107. Kagan, I.G. Advances in the immunodiagnosis of parasitic infections. *Parasitenk.* 1974., 45: 163-195.

108. Kagan, I.G. and Bargai, U. Studies on the serology of trichinosis with hemagglutination, agar diffusion tests and precipitin ring test. *Journal of Parasitology.* 1956., 42: 237- 245.

109. Bassen, F.A., Thompson, A.E., Silver, A. The occurrence of false positive trichina precipitin test in infectious mononucleosis. *Journal of laboratory Clinical Medicus.* 1949., 34: 543- 548.

110. Frish, A.W., Whims, C.B. and Oppenheimer, J.M. Complement fixation and precipitin test in trichinosis. *American Journal Clinical Pathology.* 1947., 17: 24-28.

111. Melcher, L.R. and Campbell, C.H. A serology active polysaccharide from *Trichinella spiralis*. *Science.* 1942., 96: 431- 432.

112. Sadun, E.H., Anderson, R.I. and Williams, J.S. In Campbell, W.C. *Trichinella and trichinosis*. Pleum, New York. 1983., 406 pp.

113. Despommier, D.D., Campel, W.C. and Blair, L.S. Helminth diseases. In: Walls, K.W. and Schantz, P.M. *Immunodiagnosis of parasitic disease Vol. I.* Academic Press London. 1986., pp: 168.

114. Dzibinski, T.H., Plonska, W.S. and Jedrzejewsca, B. In: Campbell, W.C. *Trichinella and trichinosis*. Pleum, New York. 1983., pp: 410.

115. Sadun, E.H. and Norman L. A practical flocculation test for the serodiagnosis of trichinosis by the state laboratories. *Publication Health Laboratory.* 1955., 13: 147-152.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

-
116. Kagan, I.G. and Norman, L. Serodiagnostic of parasitic disease. In: J.E- Blair, E.H. Lennette and J.T. Truant (ed). Manual of Clinical Microbiology. American Society of Microbiology. Bethesda. 1970. pp: 453-484.
117. Price, S.G. and Weiner, L. M. Use of hemagglutination in the diagnosis of trichinosis. American Journal of Clinical Pathology. 1956., 26: 1261- 1269.
118. Calderón, C. and Kinierimn, F. Helminthic diseases. In: Walls, K.W. and Schantz, P.M. Immunodiagnosis of parasitic disease Vol. I. Academic Press London. 1986., pp: 168.
119. Jackson, G.J. Fluorescent antibody studies of *Trichinella spiralis* infections. Journal of Infection and Disease. 1959., 105: 97-101.
120. Brzosko, W., Goncarz, Z. And Nowolaski, A. Immunofluorescence in the serological diagnosis of *Trichinella spiralis* infection. Experimental Medicine and Microbiology. 1965., 17: 335-365.
121. Coltori, E.A. Evaluación de la inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico y la seroepidemiología de la triquinosis humana. Acta de Bioquímica Clínica Latinoamericana. 1981., 15: 599-607.
122. Ivanoska, D., Cuperlovic, K.m Gamble, R. and Murrell, K.D. Comparative efficacy of antigen and antibody detection test for human trichinellosis. Journal of Parasitology. 1989., 75: 38 - 41.
123. Sadun, E. H. Recent advances on the serological diagnosis of trichinosis. Proceeding Firth. International Conference of Trichinellosis. 1962., 266-274.
124. Sultzer, A.J. In : Campbell, W.C. *Trichinella* and trichinosis . Pleum, New York. 1983., 406 pp.
125. Ljungstrom, I., Engvall, E. and Ruitenberg, E.J. In: Campbell, W.C. *Trichinella* and trichinosis . Pleum, New York. 1983., 406 pp
126. Saathoff, M., Kasper, M. and Demmer, H. Helminthic diseases. In: Walls, K.W. and Schantz, P.M. Immunodiagnosis of parasitic disease Vol. I. Academic Press London. 1986., pp: 168.
127. Ben, G.J.M., Malmassari, S.L., Nuñez, G.G., Constantino, S.N. and Venturiello, S.M. Evaluation of an enzymatic immunohistochemical technique in human trichinellosis. Journal of Helminthology. 1997., 71: 299-303.
128. Engvall, E. and Ljungstrom, I. In: Campbell, W.C. *Trichinella* and trichinosis . Pleum, New York. 1983., pp 410.

-
129. Mahannop, P., Setasuban, P., Morakote, N., Tapchaisri, P. and Chaicumpa, W. Immunodiagnosis of human trichinellosis and identification of specific antigen for *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology*. 1995., 25: 87- 94.
130. Gamble, H.R., Anderson, W.R., Graham, C.W. and Murrell, K.D. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Veterinary Parasitology*. 1983., 13: 349-361.
131. Gamble, H.R. and Graham, C.E. Monoconal antibody - purified antigen for immunodiagnosis of trichinosis. *American Journal of Veterinary Research*. 1984 , 45: 67-64.
132. Ortega- Pierres, G., Chayen, A., Clark, N.W.T. and Parkhouse, R. M. E. The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. 1984., 88: 359- 369.
133. Arriaga, C., Muñiz, E., Morilla, A. And Ortega - Pierres, G. *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Experimental Parasitology*. 1989., 69: 363- 372.
134. Van Knapen, F., Frachiomont, J.H., Verdank, A. R. And Stump, K.U. Detection of specific immunoglobulin (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE level in human trichinosis by means of enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1982., 31: 973 - 976.
135. Marakote, N., Knamboonrung, C., Siriprasert, V, Suphawitayanukul, S., Marcanatachote, S. and Thammasonthi, W. The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of human trichinosis. *Tropical Medicine and Parasitology*. 1991., 42: 172-174.
136. Mahannop, P., Chaicumpa, W., Setasuban, P., Marakote, N. and Tapchaisri, P. Immunodiagnosis of human trichinellosis using excretory- secretory (ES) antigen. *Journal of Helminthology*. 1992., 66: 297-304.
137. Keller, G.H., Huang, D.P., Shih, J.W.K. and Manak, M.M. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction amplification and microtiter sandwich hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990., 28: 1411-1416.
138. Morgan, U.M. and Thompson, R.C.A. PCR Detection of *Cryptosporidium*: The way forward? *Parasitology Today*. 1998., 4: 241-245.
139. Whirth, D.F., Rogers, W.O., Barker, R., Dourado, H., Suesebang, L. and Albourquerque, B. Leishmaniasis and malaria: DNA probes for diagnosis and epidemiology analysis. *Annals of New York Academic Sciences*. 1989., 569: 183-192.
140. Moser, D. R., Kirchhoff, L. and Donelson, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1989., 27: 1477-1482.

-
141. Searcy, D.C. and MacInnis, A.J. Measurement by DNA renaturation of the genetic basis of parasite reduction. *Evolution*. 1970., 24: 796-806.
142. Klassen, G.R., Thiessen, J.P. and Dick, T.A. Restriction endonuclease analysis of repetitive sequences in the *Trichinella* genome: Three strain specific patterns, *Journal of Parasitology*. 1986 a., 72: 772-775.
143. Klassen, G.R., Thiessen, J.P. and Dick, T.A. Strain specific 1.7 kilobases repetitive deoxyribonucleic acid sequence family in *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1986 b., 21: 227-233.
144. Zarlenga, D.S., Alyaman, F., Minchella, D.J. and La Rosa, G. A repetitive DNA probe specific for a North American sylvatic genotype of *Trichinella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1991., 48: 131-137.
145. De Vos, T., Klassen, R.G. and Dick, A.T. Sequence analysis of 1.6 kb repetitive element from a porcine isolate of *Trichinella spiralis*. *Nucleic Acids Research*. 1988., 17: 3114.
146. Dupouy-Camet, J., Soule, C., Guillou, J. P., Rouer, E. S., Ancelle, T. and Benarour, R. Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitology Research* 1991., 77: 180-182.
147. Dick, T. A., DeVos, T. and Dupouy-Camet, J. Identification of two isolates of *Trichinella* recovered from humans in France. *Journal of Parasitology*. 1990., 76: 41-44.
148. Dick, A. T., Lu, TdeV. and Ma, K. The Use of the polymerase chain reaction to identify Porcine Isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*. 1992 , 78: 145-148.
149. Soulé, C., Guillou, J.P. Vallet, C. and Colame, M. *Trichinella spiralis* larvae, detected by PCR in the blood of an experimentally infected horse. In: Campell, W.C., Pozio, E. and Brushi, F. (eds). *Trichinellosis. Proceeding of the Eighth International Conference Trichinellosis*. Instituto Superiore di Sanità. Press, Rome. 1993., pp 101-104.
150. Robert, F., Houzé, Cabie, A. and Dupouy-Camet, J. Detection by polymerase chain reaction of *Trichinella spiralis* larvae in blood of infected patients. *Parasite*. 1996 , 4: 391-393.
151. Uparanukraw, P. and Morakote, Nimit. Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*. 1997., 83: 52-56.
152. MacInnis, J.M. and Voge, M. *Experiments and Techniques in Parasitology*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 1970., 232 pp.
153. Dick, T.A. and Silver, B.B. Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *Journal of Parasitology*. 1980., 66: 472-477.

154. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 th. C.S.H. New York., 1989. pp: 173-187.

155. Reed, K.C. and Mann, D.A. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. Nucleic Acids Research. 1985., 13: 7207-7220.

APENDICE 1

AISLAMIENTO DE DNA DE CÉLULAS

Esta técnica se describe a partir de 10^6 células, para otro número diferente se reajustan proporcionalmente los volúmenes.

Procedimiento

- Resuspender el paquete celular (previamente lavado con solución fisiológica, por ejemplo PBS), en 300 μ l de una solución que contenga NaCl 0.15M y EDTA 0.1M (en frío).
- Añadir Proteinasa K hasta una concentración final de 0.1 mg/ml y SDS a una concentración final de 0.5%.
- Incubar a 50°C durante 1 hora. (Generalmente incubaciones más largas pueden aumentar el rendimiento final).
- Añadir un volumen de fenol precalentado a 60°C, mezclar vigorosamente en vortex. Centrifugar durante 10 min a 8000 x g a 4°C.
- Recoger la fase acuosa y extraer con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1), mezclando vigorosamente y centrifugando a 8000 x g durante 10 min a 4°C.
- Extraer la fase acuosa con un volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1), Mezclar vigorosamente.
- Centrifugar en las condiciones ya señaladas.
- Extraer con éter etílico, centrifugando 3min en las condiciones anteriores.
- Separar la fase acuosa y añadirle 0.1 volúmenes de NaAc, 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.
- Mezclar suavemente hasta que la madeja formada por el DNA se haga evidente, dejar precipitar a -20°C (de 2 a 12hrs) y luego centrifugar a 10000 x g durante 20min.
- Lavar la pastilla con etanol al 80% y dejar secar y resuspender en 100 μ l de TE.

-
- Añadir RNAasa hasta una concentración final de 20 µg/ml. Incubar a 37°C durante 30min.
 - Extraer con un volumen de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1).
 - Centrifugar durante 5 min a 8000 x g a 4°C.
 - En un tubo limpio colocar el sobrenadante cuantificado
 - Agregar 0.1 volúmenes de NaAc 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. dejar 10 min en hielo.
 - Centrifugar durante 20min a 10000 x g a 4°C.
 - Lavar con etanol al 80%.
 - Resuspender en 50µl de agua miliq y determinar la concentración para almacenar a -20°C en alícuotas de concentración conocida.
 - En ocasiones el DNA obtenido por esta técnica resulta resistente a la digestión con enzimas de restricción. Si esto ocurre se recomienda utilizar el siguiente método de purificación de DNA en alta concentración de sal.
 - Añadir 0.5 volúmenes de NH₄Ac 7.5M y dos volúmenes de etanol absoluto frío.
 - Mezclar y dejar en hielo hasta que la madeja de DNA se haga aparente.
 - Centrifugar a 10 000 x g durante 2min y lavar la pastilla con etanol al 80%.
 - Resuspender en 50µl de TE.

APENDICE 2

ELECTROFORESIS

Procedimiento

- Preparar una solución de agarosa al 1% en TAE 1X, Calentar a ebullición hasta disolverla.
- Cuando la solución este a 45° C vaciarla en un molde de acrílico de 8 x 10 x 0.5 cm, con un peine con capacidad de 20µl por orificio. Dejar polimerizar a temperatura ambiente (Aproximadamente 45 minutos).
- Colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga 500 ml de buffer TAE 1X. El gel deberá estar cubierto completamente con el buffer.
- Por otro lado en un tubo para microcentrífuga mezclar 10µl de la muestra de DNA obtenida más 2.5µl de jugo azul, homogeneizar bien y depositar la mezcla en un carril del gel.
- Correr a 100 V durante 45 min.
- Teñir por 10 minutos en una solución 0.5 mg/ml de Bromuro de etidio.
- Observar con una lámpara de luz U. V.

APENDICE 3

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Procedimiento

- En un tubo eppendorf colocar la siguiente mezcla de reacción:
- 10ng - 1 μ g de DNA genómico.
- 0. 3 μ M de cada iniciador.
- 200 μ M de dNTPs.
- 1.5mM de MgCl₂
- Amortiguador específico 1X.
- 2.5U de Taq* DNA polimerasa
- c b.p.100 μ l de agua miliq.
- (Estas cantidades varían de acuerdo al DNA específico que se este utilizando).
- Al agregar cada reactivo se debe microfugar 10seg para asegura que todos los reactivos se depositen en el fondo del tubo.
- Agregar 20 μ l de aceite mineral para evitar evaporaciones durante los diferentes ciclos de temperatura.
- Colocar el tubo conteniendo la mezcla de reacción en el termociclador y someterlo a condiciones específicas de amplificación, programadas para cada DNA.

APENDICE 4

TRANSFERENCIA DE DNA DE GELES DE AGAROSA A MEMBRANAS (southern blot).

Procedimiento

- Si se van a transferir fragmentos de DNA de elevado peso molecular (> de 1Kb) es conveniente sumergir el gel en una solución de HCl 0.25M durante 10 minutos para facilitar la rotura del DNA a fragmentos más pequeños y, por lo tanto, más fácilmente transferibles.
- A continuación realizar un lavado de 5 minutos con agua destilada para retirar el exceso de ácido. Desnaturalizar el DNA, sumergiendo el gel en una solución de NaOH 0.5M - NaCl 1.5M. Incubar durante 30 minutos con agitación suave.
- Hacer un lavado de 5min con agua destilada para retirar el exceso de sosa
- Sumergir el gel en una solución neutralizante de Tris-HCl 0.5M, pH 8 y NaCl 1.5M e Incubar 30 min con agitación suave.
- Cortar la membrana y tres hojas de papel filtro 3MM del tamaño del gel a transferir.
- La transferencia del DNA del gel hasta la membrana va a producirse por arrastre salino, para ello colocar una solución de SSC 20X dentro de una bandeja y con la ayuda de un soporte sólido y papel filtro formar un puente de manera que, la solución este en contacto con el gel de agarosa.
- Sobre el gel colocar la membrana previamente equilibrada con SSC 2X.
- Colocar una hoja de 3MM, igualmente equilibrada, después colocar las otras dos hojas de papel filtro y una esponja o un paquete de toallas absorbentes de 2-3 cm de grosor.
- Para mejorar el proceso es necesario colocar una placa de vidrio y un peso de aproximadamente 500g, que comprima el montaje y permita una transferencia homogénea. Cubrir los extremos con papel plastificado, para evitar evaporaciones. El tiempo mínimo de transferencia es de 2 y hasta 12 horas.

-
- Una vez completa la transferencia, dismantelar el sistema y enjuagar la membrana con SSC 2X para desprender restos de agar.
 - Dependiendo del tipo de membrana utilizado en la transferencia, el proceso de fijación del DNA será distinto. En las membranas de Hybon-N, el DNA se fija por exposición al U.V durante 1-2 minutos, con el objeto de originar uniones covalentes entre los residuos de timina y los grupos amino cargados positivamente que se encuentran en la superficie de la membrana.

APENDICE 5

HIBRIDACIÓN CON UNA SONDA MARCADA CON FLUORESCEÍNA

1. MARCAJE DE LA SONDA pPRA

Procedimiento

- Tomar el DNA que va a servir de sonda 500ng y calentarlo a ebullición durante 10min, inmediatamente pasar a hielo y mantener en frío durante 5min.
- Preparar la siguiente mezcla de reacción, en un volumen total de 30 μ l.
 - 5 μ l de mezcla de hexanucleotidos (iniciadores)
 - 5 μ l de mezcla de dNTP'S con dATP-Fluoresceína.marcaje con dNTP.
 - 500 ng de DNA desnaturalizado.
 - 5 μ l de agua miliq.
 - 1 μ l de enzima Klenow.
- Mezclar bien todos los componentes e incubar 1 hora a 37°C.
- Parar la reacción añadiendo 2 μ l de EDTA 0.2M pH 8. Almacenar a -20°C.
- La sonda debe desnaturalizarse, justo antes de ser utilizada.

2. HIBRIDACIÓN

Procedimiento

- La membrana se va a prehibridar con 5ml de la siguiente solución:
 - SSC 5X
 - SDS 0.1%
 - Reactivo de bloqueo 0.5%
 - Solución Dehart's 5 %.
- Si la membrana esta seca se debe sumergir antes en SSC 5X y prehibridar a 65°C durante 1 hora mínimo.
- Mezclar la sonda desnaturalizada con 5ml de solución de hibridación y añadir a la membrana.
- Hibridar a 65°C durante 6-12 hrs.

2. LAVADOS DE ASTRINGENCIA

Procedimiento

- Se realizan lavados de astringencia para eliminar las señales no específicas.
- Lavar la membrana con SSC 2X - SDS 0.1% durante 15 minutos a 65°C.
- Lavar con una solución de SSC 0.2X - SDS 0.1% durante 15 minutos a 65°C.

3. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO

Procedimiento

- Adicionar a la membrana 5ml buffer 1, el cual contiene:
 - Tris-HCl 0.1 M. pH 7.5
 - NaCl 0.15M
- Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- Bloquear la membrana en buffer 2 por una hora a temperatura ambiente y con agitación constante.
- El buffer 2 consta de reactivo de bloqueo al 0.5% en buffer.
- Colocar la membrana en 5 ml de la solución del anticuerpo e incubar por 1 hora a 37°C.
- El anticuerpo debe ir diluido 1:1000 en buffer 2
- Lavar 4 veces con Buffer 1, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4. DETECCIÓN POR LUMINISCENCIA

Procedimiento

- Preparar el reactivo de quimioluminiscencia mezclando volúmenes iguales de luminol y el reactivo oxidante (H_2O_2) inmediatamente antes de usar. (Se debe usar por lo menos 0.125 ml por cm^2 de membrana.
- Colocar la membrana en una caja limpia y seca y agregar el reactivo de quimioluminiscencia sobre la membrana.
- Agitar suavemente la membrana por un minuto asegurándose de que la mezcla la cubra perfectamente.

-
- Tomar la membrana con unas pinzas y eliminar el exceso de solución sobre un papel filtro.
 - Colocar la membrana preparada en el cassette de exposición.
 - Exponer el film y revelar. La sensibilidad puede aumentar si se prolonga la exposición durante toda la noche.