



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS CONTRA HELMINTOS TISULARES Y
BACTERIAS EN SUEROS DE COATÍES (*Nasua narica*) Y MAPACHES(*Procyon lotor*)
DE UNA POBLACIÓN SEMI CAUTIVA PERTENECIENTE AL PARQUE DE LA
VENTA DEL ESTADO DE TABASCO “**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

VÍCTOR HUGO GODÍNEZ GARCÍA

ASESOR:

M. EN I.B.B. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA

CO-ASESORA:

M. EN C. CLAUDIA IRAIS MUÑOZ GARCÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

Búsqueda de anticuerpos contra helmintos tisulares y bacterias en sueros de coatíes (Nasua narica) y mapaches (Procyon lotor) de una población semi cautiva perteneciente al Parque de la Venta del estado de Tabasco

Que presenta el pasante: **Víctor Hugo Godínez García**
Con número de cuenta: **30308207-5** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Agosto de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes	
SECRETARIO	MIBB. Jorge Luis de la Rosa Arana	
1er SUPLENTE	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
2do SUPLENTE	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm



DEDICATORIA

A mi madre

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser la persona que soy, y a la que le admiro su fortaleza de carácter a pesar de todos los problemas a los que se ha enfrentado en su vida, siempre saliendo alerosa por sobre todas las cosas, un ejemplo de vida de la que he aprendido tantas cosas y le estoy tan agradecido por todo lo que me ha brindado pero más que nada, por su amor.

A mi familia

Porque creyeron en mí y me impulsaron a salir adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí. Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles. A todos, espero no defraudarlos y contar siempre con su valioso apoyo, sincero e incondicional.

A mis amigos

A cada uno de mis amigos los cuales han sabido brindarme su amistad, la cual espero perdure mucho tiempo más, porque todos ustedes han sido tantas veces parte aguas de mi vida, han marcado mi vida de alguna forma y me han abierto los ojos al mundo, gracias a todos.

.



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a mis asesores de tesis, el Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana y la M. Claudia Irais Muñoz García, sus conocimientos invaluableles que me brindaron para llevar a cabo esta investigación, y sobre todo su gran paciencia para esperar a que este trabajo pudiera llegar a su culminación.

Al InDRE le agradezco por las facilidades para la realización de este proyecto durante mi estancia en esta institución.

Agradezco a todos mis amigos del laboratorio de Helmintos tisulares (Alfredo, Belén, Gely, Sinuhe, Tere) que hicieron más amena mi estancia, además de la ayuda prestada y consejos durante la realización de este proyecto.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme acogido en sus aulas, a todos mis catedráticos por compartir sus conocimientos y enseñanzas.

Agradezco a los miembros del jurado, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo, aún a pesar de tantas actividades que los ocupan.



SALUD
InDRE



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE HELMINTOS
TISULARES DEL INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS
(InDRE) BAJO LA DIRECCIÓN DEL M. EN I.B.B. JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA



ÍNDICE GENERAL

Contenido

1. Introducción.....	1
1.1 Generalidades sobre Parque Museo “La Venta”	1
1.2 Generalidades sobre coatíes y mapaches.....	2
1.3 Helmintos y bacterias asociados a procionidos	5
1.4 Infecciones transmitidas de manera zoonotica por procionidos	9
1.5 Importancia de las zoonosis en zoológicos	10
1.6 Respuesta inmune contra bacterias intracelulares y helmintos	12
1.7 Determinacion de anticuerpos	16
1.8 Origen de los antígenos	18
Antígenos febriles	
1.8.1 <i>Salmonella</i>	18
1.8.2 <i>Brucella</i>	19
1.8.3 <i>Rickettsia</i> y <i>Proteus</i> OX-19	20
Antígenos de helmintos	
1.8.4 <i>Fasciola hepatica</i>	22
1.8.5 <i>Taenia crassiceps</i>	24
1.8.6 <i>Toxocara canis</i>	26
1.8.7 <i>Ascaris suum</i>	29
1.8.8 <i>Trichinella spiralis</i>	31
2. Justificación.....	34
3. Objetivo general.	35
4. Objetivos particulares	35
5. Diagrama general de trabajo.....	36
6. Materiales y metodos.....	37
6.1 Obtención de muestras sanguíneas y procesamiento para obtención de sueros	37
6.2 Antígeno de excreción y secreción de <i>Toxocara canis</i> y <i>Trichinella spiralis</i>	37
6.3 Extracto total antigénico de <i>Fasciola hepatica</i> y <i>Ascaris suum</i>	40
6.4 Fluido vesicular de <i>Taenia crassiceps</i>	41
6.5 Ensayo inmunoenzimatico (ELISA).....	41
6.6 Inmunoelectrotransferencia (IET)	42
6.7 Aglutinación para bacterias	46



7. Resultados.....	47
7.1 Sueros de coaties y mapaches.....	47
7.1 Obtención de helmintos.....	49
7.2.1 <i>Fasciola hepatica</i>	49
7.2.2 <i>Taenia crassiceps</i>	49
7.2.3 <i>Toxocara canis</i>	50
7.2.4 <i>Trichinella spiralis</i>	50
7.2.5 <i>Ascaris suum</i>	51
7.3 Preparación de antígenos y determinación de proteínas	51
7.4 Perfil electroforético de los antígenos	52
7.5 Titulación de conjugado y suero.....	53
7.6 Determinación de anticuerpos por ELISA	57
7.6.1 Determinación de anticuerpos contra <i>Ascaris suum</i>	57
7.6.2 Determinación de anticuerpos contra <i>Fasciola hepatica</i>	59
7.6.3 Determinación de anticuerpos contra <i>Taenia crassiceps</i>	60
7.6.4 Determinación de anticuerpos contra <i>Toxocara canis</i>	61
7.6.5 Determinación de anticuerpos contra <i>Trichinella spiralis</i>	62
7.7 Determinación de anticuerpos mediante inmunoelectrotransferencia.....	63
7.8 Determinación de anticuerpos mediante aglutinacion(Reacciones febriles).....	65
8. Discusión	69
9. Conclusiones.....	78
10. Perspectivas	79
11. Anexo	80
12. Bibliografía.....	86



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Parque “La Venta”	1
2	Coatí (<i>Nasua narica</i> .)	2
3	Mapaches (<i>Procyon lotor</i>)	4
4	Macrófagos durante el ataque de una bacteria intracelular	13
5	Mecanismos inmunológicos de defensa contra Helmintos	15
6	Inmunoensayos para detectar anticuerpos	17
7	Estructura antigénica de <i>Salmonella</i>	18
8	<i>Brucella abortus</i>	20
9	<i>Rickettsia symptoms</i>	21
10	<i>Proteus vulgaris</i> (Tinción de Gram)	21
11	Adulto de <i>Fasciola hepatica</i>	22
12	Ciclo de vida de <i>F. hepatica</i>	24
13	Metacestodos <i>Taenia crassiceps</i>	25
14	Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	26
15	<i>Toxocara canis</i> adultos	27
16	Ciclo de vida de <i>Toxocara canis</i>	28
17	Hembra y Macho de <i>Ascaris suum</i>	29
18	Ciclo de vida de <i>Ascaris suum</i>	31
19	Larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i>	32
20	Ciclo de vida <i>Trichinella sp.</i>	33
21	Orden de colocación de los elementos para electrotransferencia	44
22	Presentación final de la membrana de NC después de la transferencia	45
23	Interpretación de resultados para aglutinación en placa	46
24	Sueros obtenidos de coatíes	47
25	Sueros obtenidos de mapaches	47
26	Distribución de sexo en muestreos 2009 a 2011 de coatíes	48
27	Distribución de sexo en muestreos 2009 a 2011 de mapaches	48



28	Distribución por edad de los sueros obtenidos de ambas especies (coatíes y mapaches) en los muestreos de 2009 a 2011.	48
29	Obtención de gusanos adultos de <i>Fasciola hepatica</i>	49
30	Obtención de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	49
31	Obtención de gusanos adultos de <i>Toxocara canis</i>	50
32	Obtención de larvas musculares de <i>Trichinella spiralis</i>	50
33	Obtención de gusanos adultos de <i>Ascaris suum</i>	51
34	Curva patrón para la determinación de proteínas de los distintos antígenos presentados en el cuadro 1	52
35	Patrón electroforético de los antígenos realizados	53
36	Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti- <i>Ascaris suum</i>	54
37	Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti- <i>Fasciola hepática</i>	54
38	Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti- <i>Taenia crassiceps</i>	55
39	Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti- <i>Toxocara canis</i>	55
40	Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti- <i>Trichinella spiralis</i>	56
41	Comparación de absorbancias entre suero de mapache y suero de ratón utilizando conjugado proteína A/peroxidasa a una dilución 1:1000	56
42	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> por ELISA	58
43	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> por ELISA	58
44	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Fasciola hepática</i> por ELISA	59
45	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Fasciola hepatica</i> por ELISA	59
46	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Taenia crassiceps</i> por ELISA	60



47	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Taenia crassiceps</i> por ELISA	60
48	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Toxocara canis</i> por ELISA	61
49	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Toxocara canis</i> por ELISA	61
50	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Trichinella spiralis</i> por ELISA	62
51	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Trichinella spiralis</i> por ELISA	63
52	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> (muestreos año 2009) por inmunoelectrotransferencia	63
53	Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> (muestreos año 2010) por inmunoelectrotransferencia	64
54	Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> (muestreos 2009-2010) por inmunoelectrotransferencia	64
55	Reactividad de los sueros de de mapaches y coatíes contra el antígeno de <i>Ascaris suum</i> (muestreos año 2011) por inmunoelectrotransferencia	65
56	Reactividad de los sueros de de mapaches y coatíes contra el antígeno de <i>Trichinella spiralis</i> (muestreos año 2011) por inmunoelectrotransferencia	65
57	Reactividad de los sueros de coatíes del periodo 2009 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	66
58	Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2009 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	66
59	Reactividad de los sueros de coatíes del periodo 2010 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	67



60	Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2010 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	67
61	Reactividad de los sueros de coatíes del periodo 2011 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	68
62	Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2011 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación	68



RESUMEN

El presente estudio es el primero en registrar la búsqueda de anticuerpos en suero contra helmintos tisulares y bacterias en coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*) de México. Ambas poblaciones están semi cautivas en el Parque Museo “La Venta”, en Villahermosa, Tabasco y se evaluaron en el periodo comprendido del año 2009 a 2011 (Verano e Invierno). El objetivo del estudio fue evidenciar la presencia de potenciales agentes zoonóticos en la fauna estudiada que puedan fungir como un factor de riesgo para la población humana local utilizando la búsqueda de anticuerpos contra bacterias, nematodos, trematodos y cestodos. Con el fin de obtener los antígenos para el inmunodiagnóstico de las familias de helmintos que posiblemente pudieran parasitar los prociónidos se usaron como marcadores los antígenos de *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis*, la búsqueda de anticuerpos se llevo a cabo empleando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunoelectrotransferencia (IET). Simultáneamente, se busco identificar la presencia de anticuerpos contra bacterias asociadas al síndrome febril, usando como marcadores antígenos febriles que se usan para detectar anticuerpos en suero contra *Salmonella thypi*, *S. parathypi*, *Brucella* y *Rickettsia* (reacción cruzada con *Proteus* OX-19), haciendo uso de la aglutinación con reactivos comerciales. Se encontró una prevalencia del 20 % de sueros que reaccionaron contra el antígeno de *Ascaris suum*. En coatíes, se encontró una frecuencia de positividad del 22.12% del total de sueros; por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue de 31.57% y 25.8% en 2009, 25.71% y 12% en 2010, 24.13% y 14.29% en 2011.

En mapaches, se encontró una frecuencia de positividad del 18.13% del total de sueros; por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue de 22.22% y 22.27% en 2009, 14.28% y 37.5% en 2010, 18.18% y 0% en 2011.

Además se encontró una prevalencia del 3.4 % de sueros que reaccionaron contra el antígeno de *Trichinella spiralis*. En coatíes, se encontró una frecuencia de positividad del 3.5% del total de sueros; por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue nula tanto en 2009 y 2010. Esto cambio en 2011 donde se encontró positividad de 6.89% y 14.28%.

En mapaches, se encontró una frecuencia de positividad del 3.3% del total sueros; sin embargo por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue nula tanto en 2009 y 2010. Esto cambio en 2011 donde se encontró positividad de 9.09% y 7.14%. En lo que se refiere a la búsqueda de aglutininas en suero no se encontraron títulos que aseveren contacto con bacterias asociadas al cuadro febril. Debido al reciente incremento en las enfermedades emergentes provenientes de animales silvestres, el estudio de las mismas y sus patógenos cobra relevancia en este estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES SOBRE PARQUE “LA VENTA”

El Parque “La Venta” (figura 1) fue inaugurado el 4 de marzo de 1958. El parque está ubicado geográficamente a 18° N, 93° O, en la parte norte de la ciudad de Villahermosa, dentro del Municipio del Centro, Tabasco. La altitud del sitio es de 10 metros sobre el nivel del mar. El Parque “La Venta” colinda al norte con la Laguna de las Ilusiones, al sur con el boulevard Adolfo Ruiz Cortinez, al oeste con el parque recreativo “Tomas Garrido Canabal” y al este con el Museo de Historia Natural. El parque “La Venta” cubre una superficie de 6.8 hectáreas en este se recrea un paisaje semejante al que se pensó podía haber existido en el lugar original donde se encontraba la cultura Olmeca. Es así que es posible ver la introducción de muestras de flora y fauna propias del territorio ocupado por esta cultura. Del total de hectáreas, 4.3 están cubiertas de bosque con presencia de vegetación secundaria e introducida con elementos de selva alta y mediana subperennifolia (Fuentes, 2001). Cuenta con una zona forestada en donde se encuentran en estado de semi cautiverio, monos aulladores (*Alouatta palliata*), ardillas (*Sciurus aureogaster* y *S. deppei*), coatíes (*Nasua narica*), mapaches (*Procyon lotor*) y un gran número de aves que visitan o residen en el parque (Beauregard, 2000). El acceso que tiene esta fauna silvestre a las instalaciones circundantes del Parque le permite tener contacto con animales domésticos, como perros y gatos, con fauna nociva como roedores y también con los transeúntes del lugar. Actualmente el parque, protege, conserva, investiga, interpreta, difunde y exhibe el patrimonio arqueológico de la cultura Olmeca descubierto en “La Venta”, Tabasco, así como la flora, la fauna y los elementos físicos que lo contemplan, junto con toda la información que se les asocie, para la educación y el disfrute del público que lo visita (Beauregard, 2000).



Figura 1. **Parque “La Venta”**. En la imagen izquierda se observa la entrada principal del parque, la imagen derecha muestra la ubicación que tiene el parque en la ciudad, la parte forestada pertenece al parque que a su vez colinda con la laguna de las ilusiones (Tomadas de <http://www.viajeros.com>).

1.2 GENERALIDADES SOBRE COATÍES Y MAPACHES

Los prociónidos (*Procyonidae*) son una familia de mamíferos del orden Carnívora, que incluye a los mapaches y los coatíes, entre otros. Se distribuyen en el continente Americano desde el sur de Canadá hasta el norte de Argentina, siendo representantes exclusivos del Nuevo Mundo. Son animales que presentan estilos de vida arbórea y movimientos rápidos de escabullimiento, de medidas medianas a pequeñas, con longitudes que van de 60 a 135 cm aproximadamente y miembros pentadáctilos. Son plantígrados a semiplantígrados, sus dígitos están separados a diferentes grados y el tercero es más grande que el resto, las garras generalmente no son retractiles y su forma es curvada y corta (Hans *et al.*, 2006).

COATÍ (*Nasua narica*)

El coatí presenta un perfil largo y bajo (figura 2) generalmente se observa con la cabeza y la cola larga vertical. El cuerpo es café oscuro, anaranjado rojizo o café amarillento, salpicado de color crema sobre los hombros. Tiene manchas sobre la garganta, debajo de los ojos y la parte inferior de las mejillas es blancuzca. Las mejillas son muy grandes. La trompa es móvil y negruzca. La cola es delgada y del mismo color del cuerpo, con o sin bandas oscuras indistinguibles. Los muslos y las patas son café oscuro o negruzcos. Las patas poseen garras fuertes y largas (Hans *et al.*, 2006).



Clasificación taxonómica:

Reino: Animalia
Subreino: Eumatozoa.
Rama: Bilateria
Filo: Chordota
Subfilo: Vertebrata
Superclase: Gnathostomata
Clase: Mammalia.
Subclase: Eutheria
Orden: Carnívora
Suborden: Caniformia
Superfamilia: Canoidea
Familia: Procyonidae
Género: Nasua
Especie: *Nasua narica*

Figura 2. **Coatí (*Nasua narica*.)** El adulto (macho) mide de la cabeza al cuerpo de 41 a 67 cm. La cola tiene una longitud de 32 a 69 cm. Los adultos pesan de 3 a 6 Kilogramos. Generalmente los machos son más grandes que las hembras. Son principalmente diurnos, retirándose por la noche a los árboles, para iniciar su labor diaria de forrajeo desde la madrugada. Omnívoros, prefiriendo pequeños vertebrados, y se alimentan también con frutos, carroña, insectos y huevos (Tomada de <http://www.minifauna.com>).

DISTRIBUCIÓN

El coatí se encuentra distribuido exclusivamente en el continente americano, desde el norte de Arizona en Estados Unidos, a través de México, América Central y del Sur (Wilson, 2005).



HÁBITAT

Habitatan en ambientes selváticos o semi-selváticos muy húmedos y cercanos a cuerpos de agua o ríos. Son animales que evitan los espacios demasiado abiertos, como las llanuras, y prefieren residir en lugares provistos de árboles y abundante vegetación donde encuentran refugio (Wilson, 2005).

ACTIVIDAD Y COSTUMBRES

Pasan gran parte de su tiempo sobre los árboles, pero muchas de sus actividades las realizan sobre el suelo firme. En la tierra se desplazan con las cuatro patas y apoyan toda la planta de la pata. Se mueven con rapidez y olfatean constantemente mientras mantiene la cola levantada (Wilson, 2005).

Entre las ramas, el coatí se desplaza con soltura, pudiendo incluso galopar sobre ellas si el grosor es considerable. La cola larga le sirve para mantener el equilibrio y si resbala la enrolla rápidamente en algún apoyo, evitando caer (Wilson, 2005).

No tienen la costumbre de almacenar comida, sino que aprovechan lo disponible, diversificando la dieta cuando es necesario. Pueden obtener su alimento en los árboles pero más comúnmente lo localizan en sus desplazamientos por tierra, mientras buscan entre el follaje (Hans *et al.*, 2006).

Las hembras y juveniles de ambos sexos llevan vida social, agrupados en manadas de individuos emparentados: una madre con sus hijos es la unidad básica del grupo y las restantes hembras son hermanas o primas de la primera. Las bandas desarrollan sus actividades durante el día; consisten principalmente en la búsqueda del alimento y siempre uno de los miembros cumple la función de vigía que ante el menor peligro advierte a los demás, quienes se dividen en grupos y se encaraman con rapidez en árboles de baja altura. Al llegar la noche, se refugian todos en lo alto de los árboles donde constituyen sus dormitorios (Hans *et al.*, 2006).

Los machos adultos llevan, en cambio una vida solitaria y son de hábitos crepusculares y nocturnos (Samudio, 2008).

ALIMENTACIÓN

El coatí es omnívoro; consume alimentos de origen vegetal y animal en proporciones variables según la época del año. Integran a su dieta frutos, insectos adultos y sus larvas, cangrejos, caracoles y pequeños vertebrados (ranas, víboras, aves y mamíferos de reducidas dimensiones). Se adaptan fácilmente a la presencia humana y a menudo se los observa incursionando los campamentos y saqueando los recipientes de basura (Wilson, 2005).

MAPACHE (*Procyon lotor*)

El aspecto del mapache es inconfundible debido a la presencia de una máscara o antifaz negro en la cara y a su peluda y anillada cola. La cabeza es bastante ancha, con unas orejas grandes y visibles, además termina en un hocico bastante puntiagudo. El pelaje tupido, es predominantemente gris negruzco con algunos matices marrones o rojizos y presenta de 5 a 10 anillos negros a lo largo de toda la cola (Wilson, 2005).



Clasificación taxonomica:

Reino: Animalia.
Subreino: Eumatozoa
Rama: Bilateria
Filo: Chordota
Subfilo: Vertebrata
Superclase: Gnathostomata
Clase: Mammalia
Subclase: Eutheria
Orden: Carnivora
Suborden: Caniformia
Superfamilia: Canoidea
Familia: Procyonidae
Género: Procyon
Especia: *Procyon lotor*

Figura 3. **Mapaches (*Procyon lotor*)** El adulto mide de la cabeza al cuerpo entre 50 y 70cm, su cola tiene una longitud de entre 20 y 25 cm. Ppesan entre 5.5 y 9 kilogramos. Especie de hábitos nocturnos con gran sentido del olfato. Omnívoros que tienen preferencia por vertebrados pequeños (Tomada de <http://www.barramedia.com.ar/animales/mapache-de-las-tres-marias.htm>).

DISTRIBUCIÓN

Procedente de América del Norte, son muy comunes desde el sur de Canadá hasta Panamá el mapache ha colonizado numerosos países debido a las fugas o liberadas intencionadas de sus propietarios; así, se encuentran también poblaciones domesticas en Alemania, Polonia, Dinamarca, antigua Checoslovaquia, Finlandia, Rusia y Francia (Wilson, 2005).

HÁBITAT

Habitan frecuentemente los ambientes arbolados o arbustivos, generalmente cerca del agua ya que se trata de un buen nadador. Aunque ha aprendido a vivir también en áreas habitadas (Hans *et al.*, 2006).

ACTIVIDAD Y COSTUMBRES

Los mapaches son nocturnos, tienen un agudo sentido del olfato y son unos excelentes trepadores y suelen tener su madriguera en un agujero en lo alto de un árbol (más de 3 metros de altura) no obstante también pueden esconderse en oquedades de rocas, tocones de árboles caídos, galerías excavadas por otros animales e incluso en construcciones humanas (Wilson, 2005).



Excepto durante los fríos inviernos, o en el caso de hembras con crías, cada guarida es ocupada sólo durante uno o dos días, ocupando cada vez otra diferente siempre en las proximidades de la anterior (Forsyth, 1999).

El mapache no hiberna ya que en los lugares cálidos se mantiene activo durante todo el invierno mientras que en latitudes muy frías entra en actividad únicamente en los momentos de buen tiempo. A pesar de esto, durante estos meses llega a perder hasta un 50% del peso total por lo que se dedica a acumular reservas de grasa durante el verano y el otoño. Se ha encontrado que los mapaches pueden ser reservorios de patógenos que transmiten enfermedades en humanos tales como la leptospirosis y la rabia por citar algunas (Forsyth, 1999).

ALIMENTACIÓN

En su hábitat natural es omnívoro, consume desde ranas hasta frutos, pero en las ciudades y suburbios echa mano de los contenedores de basura para comerse los restos de alimentos arrojados en ellos (Wilson, 2005).

1.3 HELMINTOS Y BACTERIAS ASOCIADOS A PROCIÓNIDOS

Los estudios de helmintos parásitos en coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*), son escasos y sólo se cuenta con contribuciones como los de Travassos (1917), (1923); Machado, (1940); Neal, (1960); Van *et al.*, (1974); Vicente *et al.*, (1997); Castro *et al.*, (2002); Vieira *et al.*, (2008) que dan a conocer la helmintofauna presente en especies muy cercanas a estos prociónidos como el coatí sudamericano (*Nasua nasua*) y mapache cangrejero (*Procyon cancrivorus*) al igual perteneciente a Sudamérica.

En el siguiente cuadro se muestran los helmintos descubiertos que parasitan a los prociónidos de acuerdo a los autores antes mencionados.

Especie	Helmintos encontrados
<i>Nasua nasua</i>	Phylum: Acanthocephala Clase: Archiacanthocephala Orden: Oligacanthorhynchida <i>Oncicola luehei</i> en intestino grueso (Travassos, 1917; Machado, 1940).
<i>Nasua nasua</i>	Phylum: Nematoda Superfamilia: Ancylostomatoidea Familia: Ancylostomatidae <i>Ancylostoma bidens</i> en intestino (Vieira, 2008). <i>Uncinaria bidens</i> en intestino (Vicente <i>et al.</i> , 1997).

<p><i>Nasua nasua</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Ascaridoidea Familia: Ascarididae <i>Toxocara alienata</i> en intestino delgado (Vicente <i>et al.</i>, 1997). <i>Toxocara canis</i> en intestino delgado (Vieira, 2008).</p>
<p><i>Nasua nasua</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Dioctophymatoidea Familia: Dioctophymatidae <i>Dioctophyma renale</i> en riñón, cavidad abdominal, estomago (Vicente <i>et al.</i>, 1997; Castro, 2002). <i>Dioctophyma sp.</i> (Vieira, 2008)</p>
<p><i>Nasua nasua</i> y <i>Nasua sp.</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Filarioidea Familia: Onchocercidae <i>Dirofilaria imcrassata</i> en corazón (Vicente <i>et al.</i>, 1997). <i>Dirofilaria repens</i> en tejido subcutáneo (Vieira, 2008). <i>Dirofilaria sp.</i> en corazón, arterias pulmonares (Vieira, 2008).</p>
<p><i>Nasua nasua</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Physalopteroidea Familia: Physalopteridae <i>Physaloptera semilanceolata</i> en estomago (Vicente <i>et al.</i>, 1997). <i>Physaloptera sp.</i> en intestino delgado (Travassos, 1923 ; Vicente <i>et al.</i>, 1997).</p>
<p><i>Nasua nasua</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Trichostrongyloidea Familia: Molineidae <i>Molineus nasuae</i> en intestino delgado (Vicente <i>et al.</i>, 1997).</p>
<p><i>Nasua nasua</i></p>	<p>Phylum: Platelmino Clase :Cestoda Orden: Cyclophyllidea Familia: Anoplocephalidae <i>Atriotaeonia sandgroundi</i> localización inespecífica (Travassos, 1923). <i>Taenia crassipoda</i> localización inespecífica (Vieira, 2008).</p>

<p><i>Nasua sp.</i></p>	<p>Phylum: Platelmino Clase: Trematoda Orden: Digenea Familia: Paragonimidae <i>Paragonimus rudis</i> en pulmón (Vieira, 2008).</p>
<p><i>Procyon cancrivorus</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Acuarioidea Familia: Acuariidae <i>Skrjabinoclava thapari</i> en estomago (Vieira, 2008).</p>
<p><i>Procyon cancrivorus</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Ancylostomatoidea Familia: Ancylostomatidae <i>Ancylostoma bidens</i> en intestino (Vieira, 2008). <i>Ancylostoma braziliense</i> en intestino delgado (Vieira, 2008). <i>Uncinaria bidens</i> en intestino (Vicente <i>et al.</i>, 1997). <i>Uncinaria maxillaris</i> en intestino (Vicente <i>et al.</i>, 1997).</p>
<p><i>Procyon cancrivorus</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Ascaridoidea Familia: Ascarididae <i>Toxocara alienata</i> en intestino delgado (Vicente <i>et al.</i>, 1997). <i>Toxocara canis</i> en intestino delgado (Vieira, 2008). <i>Baylisascaris procyonis</i> intestino delgado(Kazacos, 2001)</p>
<p><i>Procyon cancrivorus</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Filarioidea Familia: Onchocercidae <i>Dirofilaria sp.</i> en corazón, arteria pulmonar (Vieira, 2008).</p>
<p><i>Procyon cancrivorus</i></p>	<p>Phylum: Nematoda Superfamilia: Trichinelloidea Familia: Trichuridae <i>Pearsonema pearsoni</i> en vejiga urinaria (Vicente <i>et al.</i>, 1997).</p>

<i>Procyon cancrivorus</i>	<p>Phylum: Platelmino</p> <p>Orden: Pseudophyllidea</p> <p>Familia: Diphyllbothriidae</p> <p><i>Diphyllbothrium trinitatis</i> en intestino delgado (Vieira 2008).</p> <p><i>Diphyllbothrium sp.</i> en intestino delgado (Vieira 2008).</p>
<i>Procyon cancrivorus</i>	<p>Phylum: Platelmino</p> <p>Clase: Trematoda</p> <p>Orden: Digenea</p> <p>Familia: Dicrocoeliidae</p> <p><i>Athesmia heterolecithodes</i> en conductos biliares e hígado (Vieira, 2008).</p>
<i>Procyon cancrivorus</i>	<p>Phylum: Platelmino</p> <p>Clase: Trematoda</p> <p>Orden: Digenea</p> <p>Familia: Diplostomidae</p> <p><i>Alaria alata</i> en intestino (Vieira, 2008).</p> <p><i>Alaria nattereri</i> en intestino (Vieira, 2008).</p>
<i>Procyon cancrivorus</i>	<p>Phylum: Platelmino</p> <p>Clase: Trematoda</p> <p>Orden: Digenea</p> <p>Familia: Schistosomatidae</p> <p><i>Schistosoma mansoni</i> en sitio inespecífico de infección (Vieira, 2008).</p>

Cuadro 1. Lista de control de helmintos parásitos encontrados en mamíferos carnívoros silvestres de la familia *Procyonidae*.

Como se ha observado la helmintofauna de ambos prociónidos es bastante extensa y variada, sin embargo se le ha puesto mayor interés en el presente, al estudio de los nematodos de la familia *Ascarididae* de la cual se destaca la especie *Baylisascaris procyonis* que tiene un comportamiento similar a *Toxocara* de migrar a través de tejidos y causar infecciones que pueden llevar hasta la muerte (Kazacos, 2001; Sorvillo, 2002), debido a la confusión de su diagnóstico el hallazgo de ambos es de vital importancia en estudios realizados hoy en día ya que pueden ser transmitidos de manera zoonótica al humano por los prociónidos (Vieira, 2008).



Pese a ello aun se sigue estudiando esta familia carnívora en busca de nuevos helmintos debido que la helmintofauna de estas especies varía mucho dependiendo del lugar donde habiten y depende de factores asociados como el clima, alimentación, hábitos entre otros. Conforme a ello con certeza no se podría decir cuáles son los tipos de helmintos asociados a estas especies animales. Sin embargo los que más se han encontrado en escasos estudios taxonómicos realizados son nematodos y platelmintos (Vieira, 2008) en la región de Sudamérica específicamente en Brasil y Argentina.

En México los únicos trabajos que se tienen sobre parásitos de prociónidos son los de Caballero y Caballero, (1948) y por Salgado y Cruz, (2002) en los que se ha encontrado helmintos de la familia *Acanthocephala*, en el caso de los mapaches aunque es una especie ampliamente estudiada en EUA y Canadá, en México existen pocos estudios sobre su helmintofauna.

Los hallazgos realizados de bacterias en prociónidos se encuentra un entorno muy pobre de investigación salvo algunos estudios realizados por Jardine y colaboradores en 2011 donde se ha descrito que sea ha aislado distintos serotipos de *Salmonella* en animales salvajes en Ontario, Canadá entre los cuales se encuentran los mapaches. Y también se les asocia con contacto con *Leptospira*, *Borrelia* (transmitida por garrapatas *Ixodes scapularis*) y en ocasiones por *Rickettsia* (transmitida por pulgas *Pulex irritans*).

1.4 INFECCIONES TRANSMITIDAS DE MANERA ZOONOTICA POR PROCIÓNIDOS

En lo que respecta a mapaches y coatíes se pueden distinguir las siguientes patologías infectocontagiosas y parasitosis transmitidas de manera zoonótica: Leptospirosis, tripanosomiosis, moquillo, hepatitis, rabia, enteritis, hepatitis, parvovirus, toxoplasmosis, reservorios de *Salmonella typhi* y *Listeria monocytogenes* por destacar algunas. La Baylisascariasis provocada por *Baylisascaris procyonis* es de especial interés por el peligro que supone para la salud de la población humana que tiene prevalencia muy alta en mapaches y se desconoce su predominio en coatíes, las larvas de este ascárido tienen la capacidad de migrar a través de los tejidos hasta infectar los globos oculares y el cerebro produciendo la muerte o secuelas neurológicas permanentes (Stringfield, 2007; Kazacos, 2001 y Sorvillo, 2002).

Otro helminto *Dirofilaria immitis* se ha encontrado en esta familia de vertebrados en particular en coatíes como hospedadores accidentales aunque se ha encontrado en prevalencias muy bajas (Gómez y cols., 1999; Miller, 1999), este helminto parasita el sistema circulatorio afectando arterias pulmonares y el ventrículo derecho del corazón, *D. immitis*, la prevalencia del helminto ha sido reportado en casi todo el mundo, sobre todo en zonas tropicales y subtropicales ribereñas



o con humedad constante (Polizopoulou *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2000) es transmitido por la picadura de mosquitos del género *Aedes* sp. y *Culex* sp. entre otros que actúan como vectores.

1.5 IMPORTANCIA DE LAS ZONOSIS EN ZOOLOGICOS

El control parasitológico en un zoológico es un aspecto importante para el cuidado preventivo de la salud animal, particularmente en los zoológicos en clima cálido y tropical. Estos zoológicos se presentan un índice elevado de enfermedades parasitarias, debido a las condiciones favorables de luz, temperatura y humedad que se presentan en dichos hábitats. La falta de higiene constante y la permanencia de los animales en un mismo sitio de alojamiento durante meses o años pueden ser factores que predisponen la ocurrencia de enfermedades parasitarias. En el Parque Museo “La Venta”, las afecciones parasitarias en los animales ocupan un lugar muy importante por su alta morbilidad y los daños que pueden ocasionar a la salud, así como las repercusiones económicas para el control estas enfermedades (Beauregard, 2000).

El número de parasitosis se incrementa con el aumento de la población humana, afectando así a más del 25% de los habitantes del planeta (Protol, 2003), ya que el incremento de los desechos sólidos influye en el desarrollo de infecciones con parásitos helmintos (Baig *et al.*, 2007). Sobre todo, si se considera que los depósitos de basura se encuentran al alcance de los animales peridomésticos y silvestres, convirtiéndolos de esta manera en transmisores potenciales de patógenos.

Los patógenos de animales silvestres contribuyen al incremento de las enfermedades emergentes y re-emergentes como una amenaza para la salud pública. La emergencia de estas y otras enfermedades humanas ocurren cuando los patógenos de los hospedadores pueden llegar y establecerse en la especie humana. Los agentes infecciosos pueden seguir transfiriéndose entre diferentes especies animales y continuar siendo reservorios, convirtiéndose así en enfermedades epizooticas (Morse, 1993).

Los cambios ocasionados por el hombre en la vida silvestre, el aumento demográfico y la mayor tasa de contacto con seres humanos, vida silvestre y animales domésticos es posible que hayan conducido a la aparición de nuevas enfermedades en humanos y animales (Krause, 1992). También los cambios climáticos en el planeta han producido alteraciones en los patrones de comportamiento de los hospedadores y vectores.

De igual manera la entrada abrupta del humano al ecosistema de los bosques y llanuras. La alteración en los ecosistemas puede crear condiciones que facilitan la aparición o dispersión de nuevas enfermedades. Los patógenos emergentes son aquellos que surgen en una población por primera vez, o que han existido e incrementan rápidamente su prevalencia (Krause, 1992). Las enfermedades emergentes han estado relacionadas con grandes mortalidades en la vida silvestre.



Un ejemplo de enfermedad emergente ocurrió en el año 2003 cuando se confirmó la presencia de fiebre amarilla por histopatología en el hígado en monos aulladores (*Alouatta seniculus*) procedentes del Parque Ecológico Los Besotes municipio de Valledupar, Colombia, donde estos monos fueron puestos en cuarentena para evitar o limitar el riesgo de que la enfermedad se extendiera y se procedió a realizar una vacunación de la población receptiva para controlar nuevos casos (Morse, 1993; Sivigila, 2003).

La aparición de enfermedades emergentes se origina algunas veces de la fauna silvestre. Estas son coadyuvadas cuando existen alteraciones ocasionadas por el hombre o por el desplazamiento de los microorganismos a lugares donde no existían.

Otras formas de expansión en las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, se asocian con los mecanismos de transmisión de ciertas patologías, que inicialmente fueron originadas desde una especie animal, en la cual la zoonosis a humanos aparece como un evento raro. Esta se da por un salto del patógeno al hombre, que es poco frecuente, pero que perpetúa la enfermedad temporal o permanentemente. Como consecuencia, el ciclo humano-humano mantiene la infección por algún tiempo, como el caso del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del síndrome agudo respiratorio severo, influenza A y virus del Ébola (Krause, 1992).

Asimismo, el movimiento de patógenos o de vectores, el mayor acercamiento a las zonas donde habita la fauna silvestre, dada por destrucción de los hábitats naturales (Pereira, 2008). Pueden originar zoonosis en los cuales se encuentran involucrados directamente los vectores animales como factores desencadenantes de infección humana (pulgas, garrapatas, mosquitos, etc.) que puede propiciar enfermedades como la infección por virus Nipah, virus del oeste de Nilo, lyssavirus, hantavirus, enfermedad de Lyme (borreliosis), peste bubónica, tularemia, leptospirosis, leishmaniosis y ehrlichiosis.

De esta manera, las zoonosis son reconocidas como un problema de salud pública en todo el mundo, por lo que existe la necesidad de analizar todos sus componentes de las cadenas epidemiológicas: parásitos, reservorios, hospedadores (humanos y animales) y ambiente (Hafezz, 2003).



1.6 RESPUESTA INMUNE CONTRA BACTERIAS INTRACELULARES Y HELMINTOS

BACTERIAS INTRACELULARES

Algunas bacterias son capaces de sobrevivir y replicarse dentro de células del hospedador. Ciertas bacterias patógenas como *Salmonella*, *Rickettsia*, *Proteus*, *Brucella* entre otras, son capaces de sobrevivir y multiplicarse aún dentro de los fagocitos (Luster, 2002).

Como estas bacterias están en un nicho inaccesible a los anticuerpos circulantes, su eliminación requiere mecanismos inmunes distintos a los de las bacterias extracelulares (Luster, 2002).

Los mecanismos centrales de la inmunidad innata frente a estas bacterias son la fagocitosis y la acción de células natural killer (NK). Sin embargo, las bacterias intracelulares son resistentes a la degradación dentro de los fagocitos mononucleares. Dicha resistencia contribuye en gran medida a que algunos patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* sean capaces de permanecer por largos períodos en el hospedador, reaparecer luego de curas aparentes y establecer infecciones crónicas de difícil erradicación (Abbas, 2003). Por otro lado, estas bacterias inducen activación de células NK, ya sea directamente o mediante producción de citocinas (específicamente interleucina 12 o IL-12) derivadas de macrófagos.

Las células NK activadas secretan IFN- γ , que es a su vez un potente activador de los macrófagos, mejorando su capacidad fagocítica y microbicida. Este proceso podrá retrasar el crecimiento de la bacteria; sin embargo, la resolución definitiva de la infección requiere de la inmunidad adaptativa (Abbas, 2003). En tal sentido, se considera que las células NK como las células claves para la diseminación las bacterias intracelulares mientras se desarrolla la inmunidad adaptativa (Luster, 2002).

La principal respuesta inmune contra estas bacterias es la inmunidad mediada por células. Muchos antígenos proteicos de estas estimula las respuestas de células T CD4+ y CD8+ y ambos tipos celulares contribuyen al desarrollo de inmunidad protectora contra las bacterias intracelulares. Una función efectora central para eliminar estos microorganismos es mediada por macrófagos activados por citocinas (particularmente IFN- γ), derivadas de células Th1 activadas (figura 4). Por otro lado, las células T CD8+ activadas pueden actuar como linfocitos citotóxicos sobre células infectadas, que presentan antígenos bacterianos en el contexto de MHC clase I (Janeway, 2001). Las diferencias en el tipo de respuesta mediada por células T, pueden explicar las distintas manifestaciones clínicas asociadas a una infección causada por un microorganismo en individuos diferentes.

En algunas situaciones, esto se ha explicado por el entorno de citocinas secretadas en el transcurso de la respuesta, que determina la expansión de un grupo de células Th1 o Th2, que inducen mecanismos efectores distintos. Mientras una respuesta de tipo 1 favorece la inmunidad celular y determina niveles bajos de anticuerpos, una respuesta de tipo 2 determinará lo contrario altos títulos de anticuerpos y baja inmunidad celular (Janeway, 2001).

Debido a lo antes mencionado, estas bacterias han desarrollado mecanismos que las hacen resistentes a la fagocitosis y que persisten por largos períodos aún en individuos con inmunidad celular efectiva. Dicha persistencia genera una estimulación antigénica crónica, que puede conducir a la formación de acúmulos de macrófagos activados que rodean los microorganismos impidiendo su diseminación formando reacciones granulomatosas crónicas.

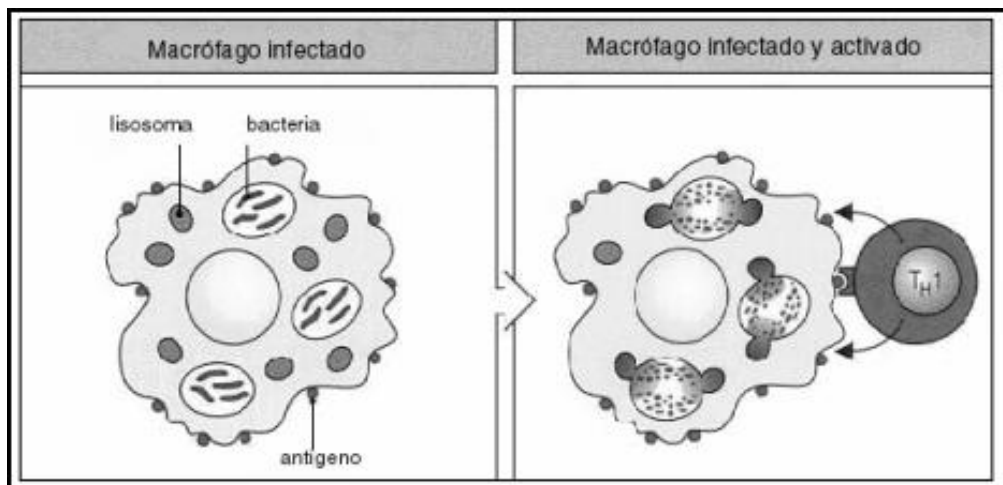


Figura 4. **Macrófagos durante el ataque de una bacteria intracelular.** En la imagen izquierda se aprecia un macrófago infectado con una bacteria. Posterior a ello en la siguiente imagen este macrófago es activado por citoquinas derivadas de células Th1 (Tomada de Chabalgoity, 2008).

PARÁSITOS HELMINTOS

Los parásitos helmintos poseen estructuras y ciclos de vida muy complejos. En general miden de milímetros a centímetros, aunque las excepciones son los cestodos que llegan a medir metros (*Taenia solium*). Esto hace que presenten mayor número de antígenos y que éstos tengan especificidad de estadio (Caballero, 1998). Sin embargo, con muchos tipos de células del sistema inmune innato, incluyendo células epiteliales, aún sigue siendo desconocida la naturaleza exacta de la interacción hospedador – parásito en las helmintosis (Perrigove *et al.*, 2008).

Tras este reconocimiento, la respuesta de las células incluye la secreción de moléculas efectoras como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 y alarminas, las anteriores pueden activar directamente la diferenciación de linfocitos T hacia células CD4+ Th2, o indirectamente influyendo en la función de células presentadoras de antígenos.



Además, se ha visto que las células dendríticas pueden promover la diferenciación de linfocitos T hacia CD4⁺ Th2 cuando se estimulan con algunos productos derivados de helmintos.

No obstante, aún no es bien sabido si esta actividad es determinada por los cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, OX40L por ejemplo), ligandos Notch o algún otro factor no identificado (Perrigove *et al.*, 2008).

El papel de las células Th1 y Th2 ha llegado a constituir un dogma, en el que las respuestas mediadas por células Th1 acaban con parásitos intracelulares y respuestas Th2 eliminan los extracelulares. Según Allen y Maizels, (1997), en lugar de lo anterior, hay que considerar la existencia de mecanismos superpuestos implicados en la defensa inmunitaria mediante citocinas individuales y las rutas efectoras que son inducidas. Se ha descubierto que clones de células T específicos contra nematodos aislados de individuos generan citocinas del patrón de respuesta Th2, mientras que clones de células T contra antígenos bacterianos de los mismos individuos producen citocinas de respuesta Th1.

No está claro si la inducción de una respuesta CD4⁺Th2 por parte de los helmintos, que incluye aumento de la concentración de IgE (ayuda en la degranulación de eosinófilos y mastocitos) total, eosinofilia y mastocitosis es importante en la respuesta inmunitaria protectora o si es la responsable de los síntomas que se observan en algunas parasitosis o quizás, interviene en ambos aspectos (Caballero, 1998; Untama, 2006).

A nivel intestinal los mastocitos al degranularse liberan histamina, serotonina y leucotrienos. Estas aminas vasoactivas son neurotransmisores y causan cambios neurovasculares y neuromusculares, produciendo espasmos intestinales, diarrea y expulsión del parásito.

El eosinófilo también tiene receptores IgA que permiten la liberación de su contenido, cuando estos receptores son entre cruzados (Caballero, 1998). Una vez degranulados, los eosinófilos liberan poderosos antagonistas químicos y proteínas que incluyen: proteínas catiónicas, neurotóxicas y peróxido de hidrógeno, que contribuyen a mantener un ambiente hostil a los parásitos (figura 5).

Las demostraciones de que los eosinófilos y la IgE pueden matar parásitos *in vitro* ha provocado la extendida creencia de que estas respuestas Th2-dependientes son principalmente responsables de la destrucción de grandes parásitos extracelulares (Perrigrove *et al.*, 2006).

Sin embargo, *in vivo* existe una notoria contradicción. En la mayoría de las infecciones por helmintos aparecen grandes cargas de parásitos a pesar de las abundantes respuestas Th2 y la evidencia directa, *in vivo*, del papel de los eosinófilos, IgE o mastocitos para controlar la infección por helmintos es escasa (Caballero, 1998).

A nivel tisular se ha observado en la respuesta inmune celular contra triquinela que la presencia de eosinófilos en el infiltrado celular ayuda a mantener la integridad del parásito y que, por el contrario, la ausencia de eosinófilos induce el aumento de Sintetas de Oxido Nítrico(iNOS) y macrófagos que culminan con la muerte de la larva muscular (Fabre, 2009), lo que sugiere que la presencia de eosinófilos suprime la respuesta Th1 y con ello favorecen la sobrevivencia del parásito (de-la-Rosa *et al.*, 2012).

En humanos, las correlaciones epidemiológicas sugieren que las IgE y eosinofilia pueden ser la clave de la inmunidad protectora. En el ratón, sin embargo, varios estudios han indicado que la vacunación efectiva requiere células efectoras que secreten IFN- γ para la destrucción del parásito. Consecuentemente con estas observaciones, el aumento del número de mastocitos y eosinófilos, así como las altas concentraciones de IgE e IgG4 son característicos de los individuos infectados por helmintos (Perrigrove, 2008). Se han hecho investigaciones sobre si la respuesta Th2 tras la infección por helmintos es beneficiosa para el hospedador o para el parásito. Datos en ratones han sugerido, incluso, que la respuesta Th2 e IgE son benéficas para el parásito y, en realidad, aumentan la infección (Caballero, 1998; Pritchard, 1993).

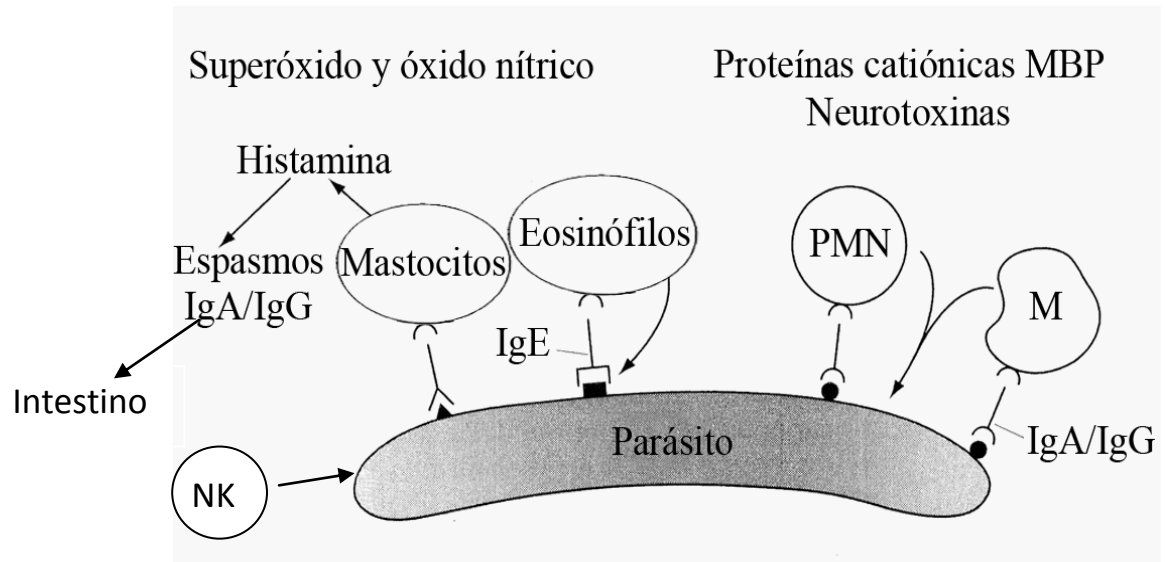


Figura 5. **Mecanismos inmunológicos de defensa contra helmintos.** Los polimorfonucleares, los macrófagos y las células NK pueden estar relacionados con este mecanismo defensivo, parece ser que principalmente estos mecanismos son mediados por los eosinófilos y los mastocitos. Ya que los helmintos son demasiado grandes para la fagocitosis, ellos necesitan ser cubiertos con IgE, IgA y IgG. Después de estos eventos, los macrófagos, los eosinófilos y los mastocitos se unen a la pared de los helmintos por medio de sus receptores y liberan el contenido celular tóxico (Tomada de <http://gsdl.bvs.sld.cu>).

1.7 DETERMINACION DE ANTICUERPOS

El inmunodiagnóstico se ha planteado como una alternativa en la búsqueda de métodos diagnósticos más sensibles y específicos, debido a que en la actualidad la detección de anticuerpos puede llevarse a cabo con relativa simplicidad y que la seroconversión se efectúa de manera temprana, usualmente de 1 a 2 semanas (Fredes, 2004).

Para la determinación de anticuerpos se utilizan un conjunto de técnicas inmunoquímicas que tienen en común el usar complejos inmunes, es decir los resultantes de la reacción de anticuerpos y antígenos, como referencias de cuantificación de un analito determinado, que puede ser el anticuerpo (ac) o un antígeno (ag), usando para la medición una molécula como marcador que hace parte de la reacción con el complejo inmune en la prueba o ensayo químico. Se basan en la especificidad y afinidad de los anticuerpos por sus antígenos específicos. Existen varias técnicas como el ELISA, el EITB, IET el IFI y la Aglutinación (Fredes, 2004).

ELISA

Es un inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado en una placa de plástico se detecta mediante un anticuerpo presente en un fluido biológico como el suero y la reacción ag-ac se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima (conjugado) capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el anticuerpos en la muestra (Lequin, 2005).

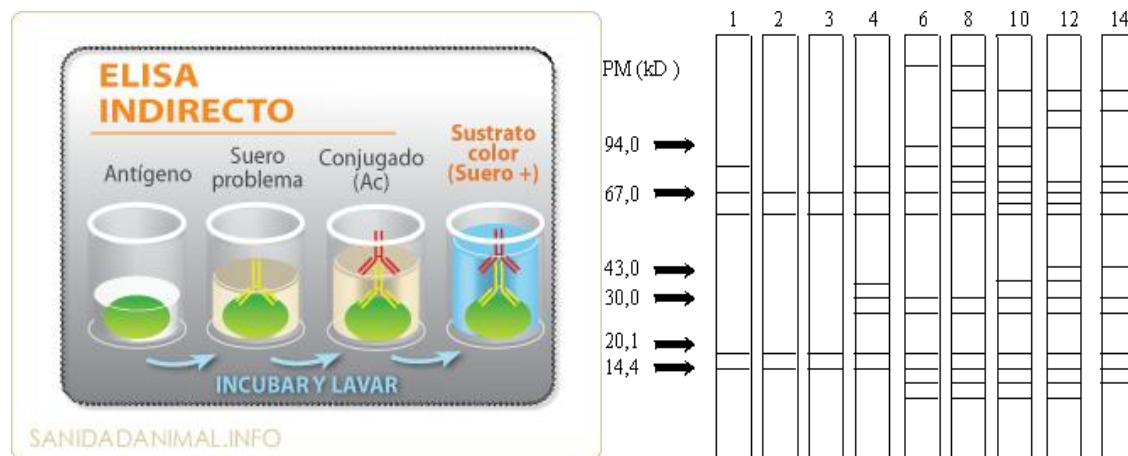


Figura 6. **Inmunoensayos para detectar anticuerpos.** En la figura de la izquierda se observa la metodología a seguir para la realización de un ELISA indirecto el cual es el más utilizado de todos los ELISAS en el que directamente se buscan anticuerpos. La figura derecha muestra una representación esquemática del reconocimiento antigénico realizado en una IET donde se observa la separación de polipéptidos de diferentes pesos moleculares en cada uno de los sistemas.



INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Es una técnica analítica usada para detectar bandas antigénicas específicas en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular). Mediante electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Hay casi tantas posibilidades como tipos de electroforesis existen. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella.

Finalmente, se detecta unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteína (de-la-Rosa, 2000).

AGLUTINACIÓN

La prueba se basa en una reacción inmunológica entre los anticuerpos séricos y el antígeno correspondiente produciendo una reacción de aglutinación macroscópica. Cuando el antígeno se encuentra unido o formando parte de células, bacterias o partículas, la reacción ag-ac se puede detectar y cuantificar por el aglutinado celular o bacteriano. De ahí su utilidad en las pruebas para reacciones febriles (Pumarola, 1987).

Reacción de Widal. Para diagnóstico de fiebre tifoidea, entérica y ondulante. Donde se determina la presencia de ac contra el ag O y H de la *Salmonella typhi* para el serodiagnóstico de fiebre tifoidea (Lucero, 2007).

Reacción de Huddleson. Detección de ac contra Brucelosis.

Reacción de Weil-Felix para la detección de ac contra Rickettsiosis como la fiebre Q, la fiebre manchada de las montañas rocallosas), esta prueba en si no busca rickettsias, se basa en la capacidad de las rickettsias para aglutinar ciertas cepas de *Proteus* (Reacción cruzada con *Proteus* OX-19) (Eremeeva, 1994).

1.8 ORIGEN DE LOS ANTÍGENOS

ANTÍGENOS FEBRILES

Los antígenos son suspensiones estabilizadas, tamponadas y estandarizadas de bacterias muertas (*Salmonella*, *Brucella abortus*, *Proteus OX-19*) preparadas para la detección y semicuantificación de anticuerpos.

1.8.1 SALMONELLA

Salmonella es un bacilo gram negativo anaerobio facultativo, con flagelos peritricos que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhi*) que se encuentra dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, género *Salmonella*, especie *enterica*, subespecie *enterica* (I), y el serogrupo D (Pumarola, 1987).

Hay 3 especies clínicamente importantes de *Salmonella*: *S. enteritidis*, *S. choleraesuis* y *S. typhi*. Aunque *S. paratyphi* también puede causar estragos clínicos (fiebre paratifoidea) en Europa y África (Eiguer, 1988).

Es responsable de la salmonelosis, una infección transmitida por fómites.

Tres síndromes principales resultan de la infección por salmonelosis: 1) gastroenteritis (la forma más común) 2) fiebre tifoidea producida por *S. typhi* o *S. paratyphi* y 3) septicemia.

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

El género *Salmonella* tiene una estructura antigénica similar al resto de enterobacterias, con tres tipos de antígenos (figura 7): Antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) o (d) y antígeno capsular o de envoltura (Vi) o (K) (específico para *Salmonella typhi*, dublin, y paratyphi C).

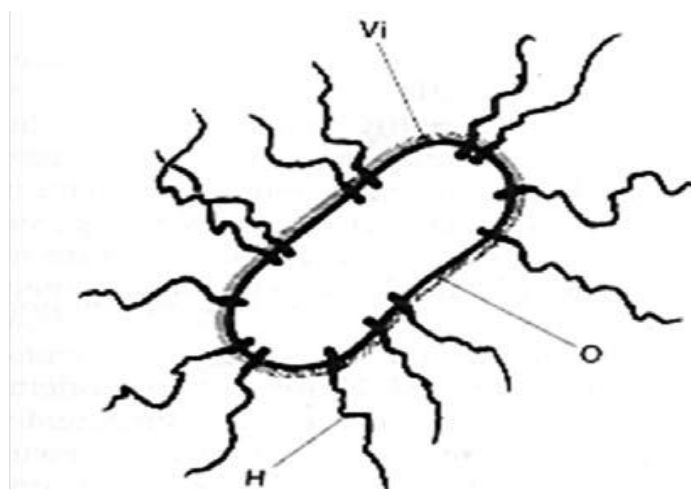


Figura 7. **Estructura antigénica de *Salmonella***. Se observan antígeno somático (O), antígeno flagelar (H), antígeno capsular o de envoltura (Vi) (Tomada de: <http://www.revista-api.com/2%20educacao%202006/pdfs/mat%2006.pdf>).



El antígeno somático O, denominado así del alemán ohne hauch, que significa sin movimiento, está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que hace parte del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular; por lo general, el antígeno O no es único (Pumarola, 1987; Popoff, 2001), que está constituido por diversos factores antigénicos, algunos de los cuales pueden ser comunes con otros serotipos y permiten dividir al género *Salmonella* en grupos O, por ejemplo, O:9 y O:12 (Sørensen, 2001).

El antígeno capsular Vi, denominado así por ser el determinante en la virulencia de esta bacteria, ya que confiere resistencia contra la respuesta inmune celular y humoral del hospedador.

El antígeno flagelar H deriva su nombre igualmente del alemán hauch, por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento, es una proteína termolábil a diferencia del antígeno O; según este, las salmonelas pueden ser monofásicas, cuando contienen siempre el mismo antígeno flagelar, generalmente específico (*S. typhi*, *S. paratyphi* A), o difásicas, cuando el antígeno flagelar se presenta alternativamente en fase específica o menos específica (Pumarola, 1987).

1.8.2 BRUCELLA

El género *Brucella* (figura 8) está constituido por bacilos Gram negativos pequeños, intracelulares facultativos, inmóviles y aerobios estrictos, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas destacan las especies *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* (Wolfgang, 1994).

Las bacterias del género *Brucella* causan una enfermedad febril zoonótica denominada brucelosis que es una enfermedad aguda o crónica que se manifiesta principalmente por escalofríos y debilidad, ocasionalmente se presentan episodios febriles ondulatorios (Wolfgang, 1994).

Los componentes de su envoltura celular tienen mucho que ver con su resistencia a los factores ambientales, poseen una envoltura celular compleja formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio (Prescott, 1998).

La membrana externa está en contacto con el medio y presenta un componente principal que es el lipopolisacárido (LPS), el cual es un antígeno inmunodominante (Prescott, 1998).

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

El componente más abundante y mejor estudiado de *Brucella* es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En este se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R. Es probable que se encuentren dos antígenos, A y M en diferentes proporciones y en las cuatro especies. Además se ha demostrado un antígeno superficial que se parece al antígeno VI de las salmonelas (Wolfgang, 1994).

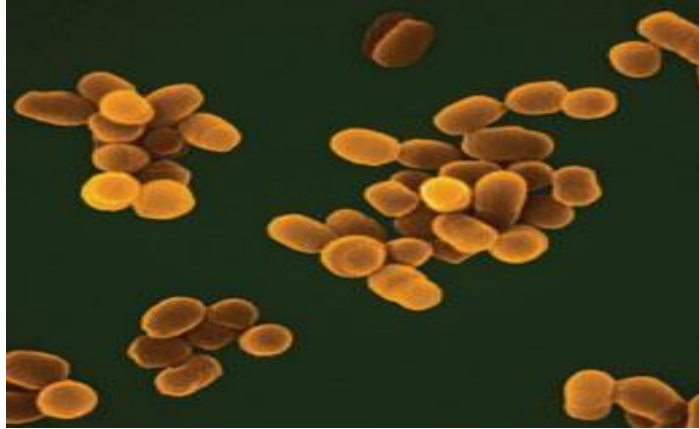


Figura 8. *Brucella abortus*. Vista tridimensionalmente en microscopio confocal laser de barrido. Donde se observa su forma de bacilo (Tomada de ALAMY).

1.8.3 RICKETTSIA Y PROTEUS OX-19

Las rickettsias (figura 9) son bacterias en forma de cocobacilos pequeños pleomorfos que actúan como microorganismos intracelulares estrictos por eso existieron dudas mucho tiempo sobre si pertenecían a los virus o a las bacterias.

Normalmente viven en ácaros, garrapatas, pulgas y piojos y pueden transmitirse a los humanos a través de las mordeduras (indolora) en la dermis por el vector por contaminación de la picadura con las heces del insecto o bien por inoculación de las mucosas con las heces contaminadas del mismo.

Suelen vivir dentro de las células que revisten pequeños vasos sanguíneos y en consecuencia, dichos vasos se inflaman o se obstruyen, o bien comienzan a perder sangre dentro de los tejidos que los rodea (Walker, 1997).

Son muy sensibles y raramente sobreviven fuera del hospedador, a excepción de *Coxiella burnetii* (productora de fiebre Q causada por *Ehrlichia sp.*) que es resistente a la desecación, al calor y la luz solar y se transmite fundamentalmente por vía aérea (Walker, 1997).

Las rickettsias se pueden dividir en:

1. Grupo Tifus: tifo epidémico, por *Rickettsia prowazekii*, transmitido por piojos (*Pulex ivitans*), y tifo clásico endémico, por *Rickettsia typha* por la pulga.
2. Grupo de Fiebre manchada: *Rickettsia rickettsii*, que implica más de 30 especies, transmitido principalmente por garrapatas (*Ixodoidea*) infectadas, mientras se alimenta de animales de sangre caliente, incluyendo a humanos.

Se ha predicho que este grupo de enfermedades van a cobrar mucha importancia en el futuro debido al incremento de su incidencia, y a la extensión de sus áreas geográficas de distribución (Parola, 2008).

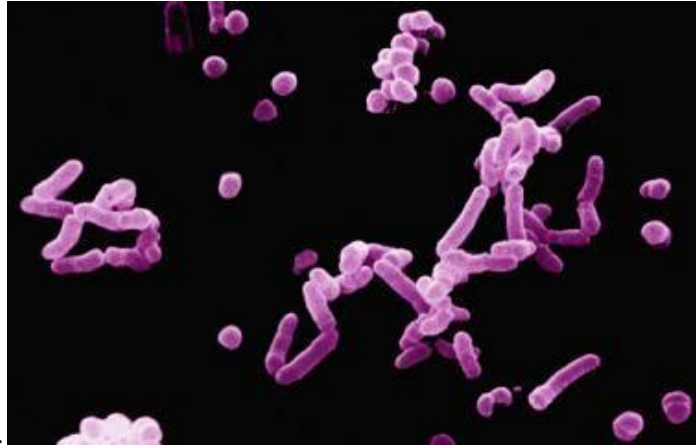


Figura 9. *Rickettsia symptoms*. Vista tridimensionalmente en microscopio confocal laser de barrido. Donde se observa su estructura cocobacilar (Tomada de www.buzzle.com/articles/rickettsia-symptoms.html).

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

Las rickettsias expresan un antígeno de grupo similar al LPS y otros de naturaleza proteica, de los cuales los más importantes son las proteínas rOmp A y rOmpB.

Proteus

Es un género de bacterias (figura 10) Gram negativas que tiene la capacidad de ser un organismo anaerobio facultativo, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* que incluye patógenos responsables de muchas infecciones del tracto urinario. Posee una gran capacidad de movilidad pues está provisto de flagelos peritricos que le ayudan a una movilidad más rápida lo que hace que tenga un fenómeno que se denomina swarming llamado así por cómo se desarrolla en los medios de cultivo especializados para este, formando pequeñas olas en el medio. Hay tres especies que causan infecciones oportunistas: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, y *P. penneri* (Wolfgang, 1994).



Figura 10. *Proteus vulgaris* (Tinción de Gram). Se pueden observar bacilos de tonalidad rosada característica de las bacterias Gram negativas que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram debido a la estructura de su envoltura celular, además se aprecia los flagelos peritricos que le proveen de gran movilidad (Fotografía de Arturo Anibal Solari, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias exacta, UNLP, Argentina).

ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

La estructura antigénica está compuesta por antígeno somático O, flagelar H y superficial K. El antígeno flagelar H contribuye a la capacidad invasora de las vías urinarias. La variante X del antígeno somático O está presente en algunas cepas de *P. mirabilis*. Otros grupos antigénicos definidos son el OX2, OX19 y OXK. El grupo OX19 (y a veces el grupo OX2) da reacciones cruzadas (aglutinación) en pacientes con *Rickettsia prowazekii* y ésta es la base de la prueba de Weil Félix (Wolfgang, 1994).

ANTÍGENOS DE HELMINTOS

1.8.4 *Fasciola hepatica*

Trematodo perteneciente a la familia *Fasciolidae*, el cual tiene el cuerpo aplanado dorsoventralmente en forma de hoja y llega a medir hasta 4 cm de longitud por 1.5 cm de ancho. Son de un color gris-rosado a parduzco. Su extremo anterior forma una proyección cónica que se extienden súbitamente para formar las así llamados “hombros”. Tiene dos ventosas, ambas en la parte anterior del cuerpo, además es hermafrodita. La superficie del cuerpo está dotada de numerosas espinas. *Fasciola* es responsable de la fasciolosis una zoonosis que afecta los conductos biliares de rumiantes, cerdos, equinos, conejos y otros herbívoros, así como al hombre (Botero, 2004).

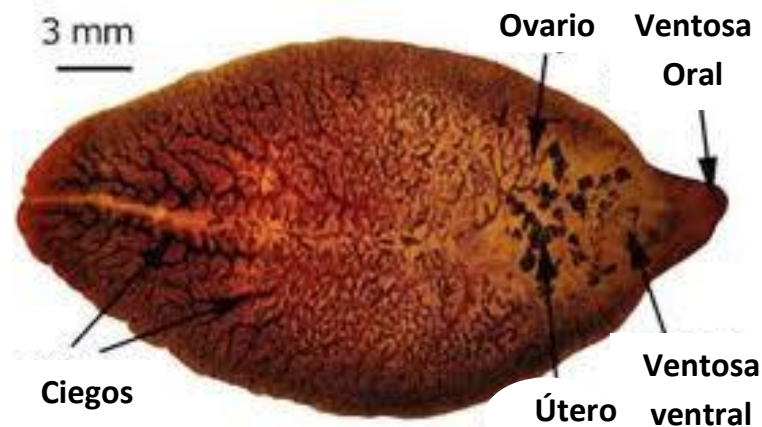


Figura 11. **Adulto de *Fasciola hepatica***. La figura muestra su morfología típica en forma lanceolada, donde se observa ciegos, útero, ventosa ventral y oral además de ovario. (Tomada de Becerril, 2008).

La distribución del trematodo es cosmopolita y se encuentra en regiones que se dedican a la crianza de ovinos, bovinos y caprinos, donde, además, también existen moluscos de diversos géneros *Lymnea* y especies que le sirven de hospedadores intermediarios (Beaver *et al.*, 2008). Según la dinámica de transmisión, se considera una zoonosis puesto que es una enfermedad común en diversos animales herbívoros que puede ser adquirida por el hombre (Becerril, 2008).



Recientemente se ha utilizado este trematodo para buscar una reactividad cruzada con otros helmintos cercanos a su línea evolutiva como se ha descubierto recientemente con los turbelarios como *Dugesia sp.*, donde los anticuerpos contra un helminto reconocen de manera heteróloga las biomoléculas inmunogénicas del antígeno del otro gusano utilizando extracto total antigénico (Almanza, 2012). Lo cual es una gran herramienta para diagnosticar un posible contacto con trematodos o un helminto cercano filogenéticamente.

CICLO DE VIDA

Los mamíferos infectados, y liberan huevos blastomerados en sus heces; los huevos son operculados (Flores 2005) y deben caer en agua dulce ,donde después de 15 días se desarrolla el miracidio, que separa el opérculo del huevo y nada hasta localizar a su hospedador intermediario (caracoles pulmonados de la familia *Lymnaeidae*), principalmente de los cuales se han descrito

L. attenuata, *L. obrussa*, *L. bulimoides*, entre otros (Becerril, 2008); penetrando en estos por acción de enzimas producidas por glándulas secretoras, orientado por quimiotropismo positivo del caracol (Morales y Pino, 2004).

Una vez que el miracidio penetra al caracol se dirige al hepatopáncreas en donde comienza un proceso evolutivo llamado poliembrionía , que consiste en el desarrollo consecutivo del miracidio a esporoquiste, redia I, redia II y cercarías (Carrada-Bravo, 2007). Las cercarias se encapsulan en el tejido de plantas, aunque también se llegan a enquistar en la superficie del agua y estructuras que se encuentran sumergidas en el agua desarrollándose las metacercarias en estas (Becerril, 2008). Las metacercarias son ingeridas y al llegar al intestino delgado, eclosionan por acción de la bilis y otros jugos digestivos, dejando libre al parásito juvenil llamado adolescercaria, el cual atraviesa la pared intestinal y se dirige al hígado, atravesando la cápsula de Glisson penetra en el parénquima hepático hasta llegar a los conductos biliares (6 a 7 semanas) y, en la luz de estos se establecen hasta desarrollarse en adultos (Beaver *et al.*, 2003). Alcanzada la madurez sexual se efectúa la fecundación cruzada o autofecundación y se inicia la oviposición, completando así el ciclo biológico (Becerril, 2008; figura 12).

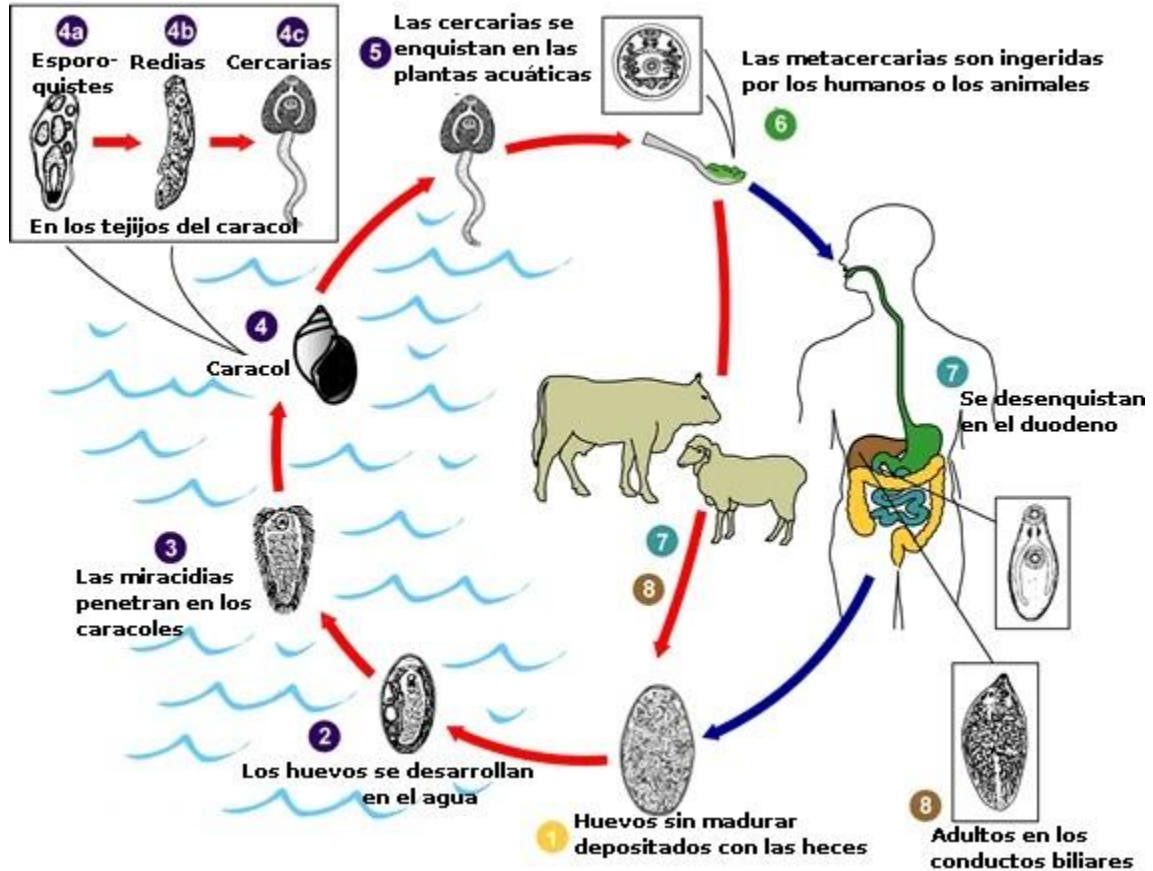


Figura 12. Ciclo de vida de *F. hepatica*. 1) Huevos blastomeros son descargados en los conductos biliares y en las heces; 2) Los huevos se embrionan en el agua; 3) Los miracidios penetran en los caracoles; 4) Invaden al hospedador intermediario, distintos géneros *Lymnaea*, *Galba*, *Fossaria* y *Pseudosuccinea*; 4a, 4b, 4c) En el caracol se presentan distintos estadios (esporoquiste, redia, cercaria); 5) La cercaria son liberadas del caracol; 6) Las cercarias se encapsulan sobre vegetación acuática u otras superficies. Los mamíferos se infectan por comer vegetación con metacercaria. 7) Las metacercarias se desenquistan en el duodeno, dando lugar a las adolescarias; 8) Migran por pared intestinal, la cavidad peritoneal y el parénquima hepático hacia los conductos biliares, donde se desarrollan en parásitos adultos (Tomada de <http://www.cdc.gov>).

1.8.5 *Taenia crassiceps*

Cestodo que pertenece a la familia *Taeniidae* a la cual también pertenecen *Taenia solium* y *Taenia saginata*, causante de dos tipos de enfermedades parasitarias, teniosis a la producida por su fase adulta que se aloja comúnmente en el intestino del zorro, caninos en estado adulto y cisticercosis a la patología producida por sus formas larvales, intermedias o juveniles (cisticercos), al afectar a los hospedadores intermediarios (roedores) en sus tejidos u órganos internos. Los metacestodos de *T. crassiceps* se reproducen asexualmente (estrobilación) por gemación siendo el único de la familia en producirlos de esta manera, el cisticerco se establece en el tejido conectivo subcutáneo, cavidades pleural y peritoneal (figura 13); Los metacestodos presentan alrededor de ellos una reacción inflamatoria la cual les permite sobrevivir durante largos periodos en su hospedador intermediario (figura 14; Larralde *et al.*, 1990).



Figura 13. **Metacestodos *Taenia crassiceps***. Los cuales se observan como una vesícula llena de líquido que contienen en su interior un escólex invaginado que presenta ventosas y ganchos. (Tomada de <http://alumnatbiogeo.blogspot.mx/2011/05/la-solitaria-podria-causar-infertilidad.html>).

Sciutto y colaboradores (1995) han obtenido importantes avances con el uso del modelo murino de cisticercosis provocada por *Taenia crassiceps*, utilizándolo para evaluación de antígenos de la familia *Taeniidae* debido a que esta presenta grandes similitudes estructurales y antigénicas por ello es una fuente de antígeno para la búsqueda de anticuerpos que pudieran evidenciar contacto con miembros de esta familia.

CICLO DE VIDA

Los proglótidos grávidos se liberan en el intestino del hospedador definitivo y se diseminan en las heces, los huevos embrionados se liberan del proglótido, ya sea al viajar por el tracto digestivo o después de que son eliminados en las heces. Estos huevos son ingeridos por el hospedador intermediario (roedores); el embrión se libera y migra a su sitio de desarrollo y se transforma en metacestodo.

Cuando el hospedador intermediario es ingerido por el hospedador definitivo (cánidos), el metacestodo se libera, el escólex se embebe en la mucosa del intestino delgado y el cuello empieza a crecer formando proglótidos (Tay, 1993)

El metacestodo es proliferativo ya que se desarrolla de manera asexual por medio de gemación. En consecuencia, la ingestión de un organismo o de unos cuantos organismos puede resultar en infecciones masivas (Loos-Frank, 1982). La vía de infección también resulta especulativa; se han propuesto la ingestión de huevos a partir del ambiente, la autoinfección a través de huevos provenientes de proglótidos grávidos dentro del intestino delgado y la ingestión de cisticercos en hospedadores intermediarios. Los huevos, ya sean ingeridos del ambiente o a través de la autoinfección, se consideran como la fuente más probable.

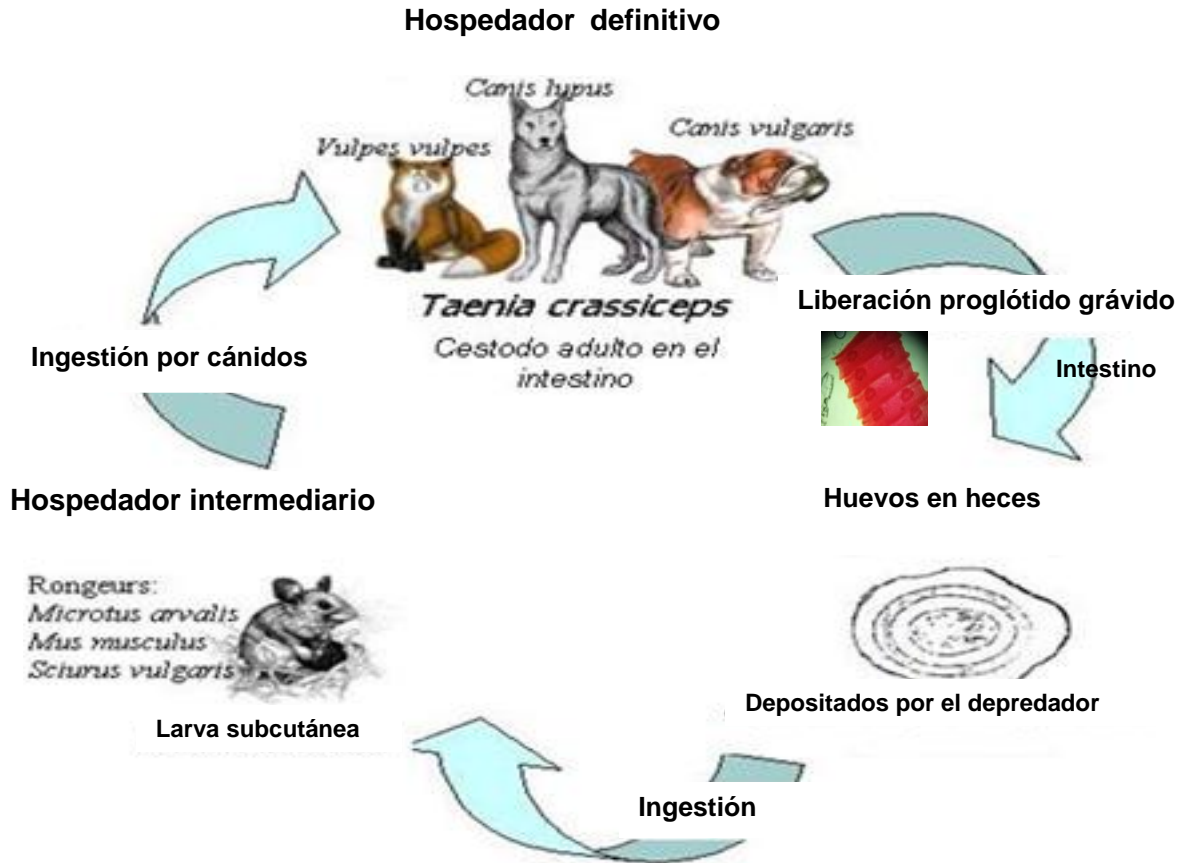


Figura 14. **Ciclo de vida de *Taenia crassiceps***. El hospedador definitivo (cánidos) es en el cual los cestodos maduran, se reproducen y generan huevos. El hospedador intermediario (roedores) es aquel en el cual se desarrolla la forma de metacestodo (inmaduro) del parásito. Los cánidos se infectan al ingerir roedores, en tanto que los roedores se infectan al ingerir huevos de un ambiente contaminado por cánidos. En general, los perros y gatos sirven como hospedadores definitivos, aunque los metacéstodos pueden desarrollarse en ocasiones dentro de ellos (Tomada de Tesis Biólogo experimental, Mario Hernández Flores, UAM Iztapalapa).

1.8.6 *Toxocara canis*

Nematodo perteneciente a la familia *Toxocaridae*, es causante de una zoonosis propiciada por los gusanos adultos, el cual presenta un cuerpo cilíndrico y no segmentado. Utilizado en este proyecto para evidenciar la presencia de anticuerpos contra este en los prociénidos los cuales están en contacto con felinos que han sido diagnosticado con *Toxocara catii*. En la región anterior presentan una boca provista con tres labios bien desarrollados y aletas cervicales además de la vulva de la hembra. En la región media se aprecia el intestino y en la posterior se identifican las gónadas y cloaca y papilas caudales de los machos. En promedio, las hembras miden unos 10-12 cm de longitud y los machos 4-6 cm. Otras características diagnósticas del género son la ornamentación de la cutícula y las espículas desiguales (figura 15).



Figura 15. *Toxocara canis* adultos. Se observa tanto macho como hembra y la diferencia de tamaños que hay entre ellos. Foto Dr. Benjamín Noguera, Depto. de Parasitología, ENCB-IPN.

Los cachorros con menos de 5 semanas albergan en su intestino numerosos gusanos adultos de *Toxocara canis*, además de abundantes larvas que han migrado a diversos órganos, ya que en cachorros de 3-6 meses el ciclo del parásito se hace cada vez menos frecuente, o no se lleva a cabo completamente hasta originar el parásito adulto, puesto que las larvas de segundo estado de desarrollo (L2) inician una migración somática que puede llevarles a numerosos órganos: hígado, pulmones, corazón, cerebro, músculo esquelético, y a la pared del tracto gastrointestinal, por lo que las larvas no alcanzan su estado (L3 y L4). En estos órganos acaban encapsulándose, iniciando una etapa de hipobiosis que les da la capacidad de permanecer infectivos durante años pudiendo activarse nuevamente y al continuar su migración en los tejidos ser causa de eventos patológicos (Beaver et al., 2003).

Cuando el tamaño de las larvas excede el diámetro de los vasos sanguíneos, perforan activamente su pared y emigran desordenadamente a los tejidos circundantes. Provocando el problema más grave por este helminto, que se denomina síndrome de larva migratoria visceral (LMV) u ocular (LMO), dependiendo del sitio donde se localicen las larvas y que también se conoce con el nombre de granulomatosis visceral verminosa u ocular (Tay, 1993).

CICLO DE VIDA

Los huevos expulsados en la materia fecal del animal infectado permanecen de 2 a 4 semanas en el suelo, para que dependiendo de la temperatura (15 a 35° C) y la humedad se torne infectante. Aunque también se puede infectar de varias formas el animal: debido a la migración transplacentaria de las larvas que han permanecido enquistadas en los tejidos de la madre, por ingestión de larvas viables en la leche materna o por el consumo de tejidos de animales que sirven como hospedadores intermediarios de las larvas infectivas que les puede ocasionar a ellos

migración de las larvas a diversos órganos del cuerpo, causando dos posibles síndromes, conocidos como larva migrans ocular y larva migrans visceral, según los órganos invadidos sean los ojos, o el corazón o el hígado, respectivamente. (Becerril, 2008).

El ciclo inicia (figura 16), al ingerir huevos infectantes de *T. canis*, que pasan al estómago, pierden sus cubiertas, eclosionan en el intestino delgado donde las larvas (L2) se desarrollan en su interior, atraviesan la pared intestinal y emigran hasta los pulmones a través de la vena porta y el hígado. En los pulmones mudan a L3 y de ahí, pasan a la tráquea, por tos o estornudos, son expulsadas al exterior o llegan a la boca y son ingeridas. Esta migración dura unos 10 días. Una vez ingerida, la larva L3 llega hasta el intestino y muda a L4 y al estado adulto, en total 25 a 30 días tras la infección (Acha, 2003).

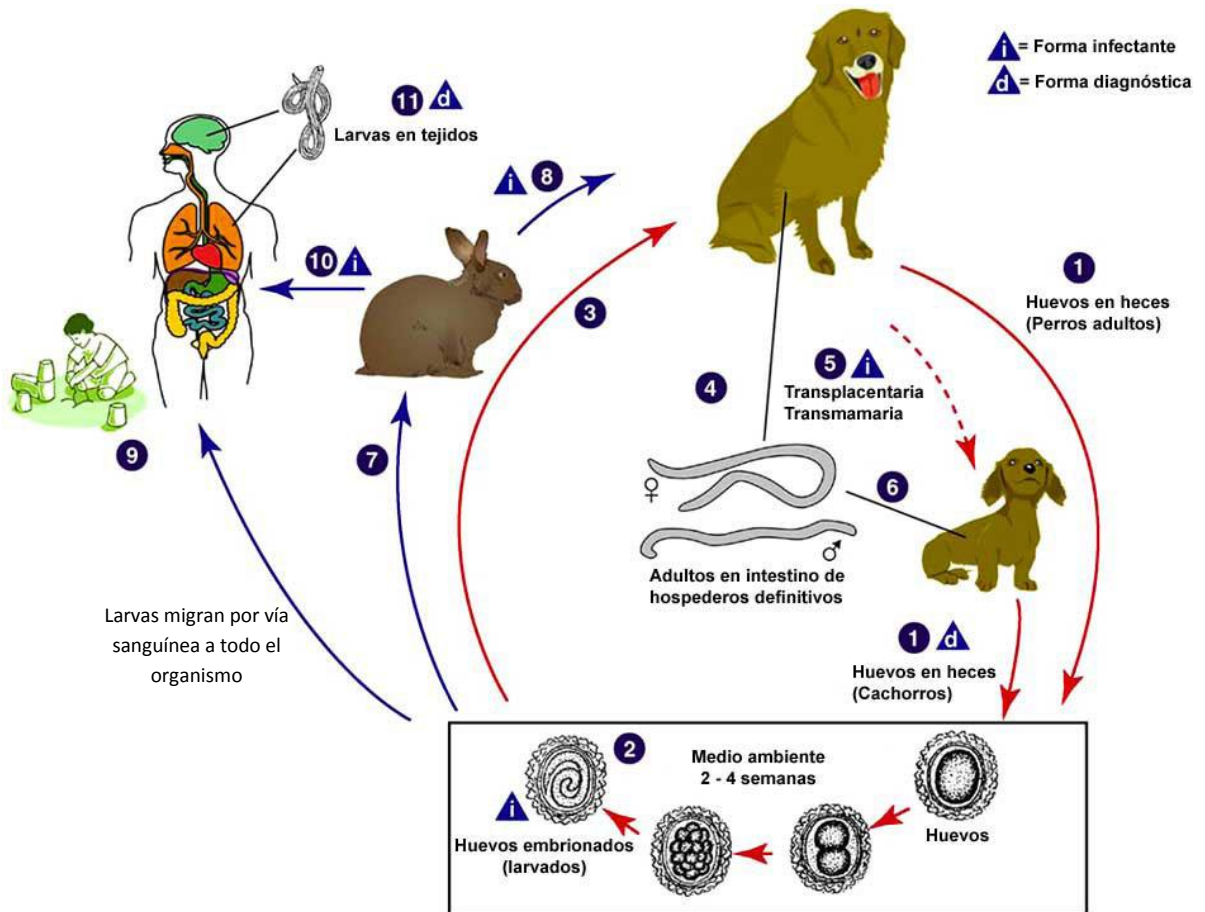


Figura 16. **Ciclo de vida de *Toxocara canis***. El hábitat de éstos parásitos es el intestino delgado de los perros. Se infecta el hospedero al ingerir los huevos eliminados por los animales presentes en alimentos contaminados, suelo u objetos contaminados. Una vez en el intestino, las larvas abandonan los huevos, penetran la pared intestinal llegando a la circulación general y alcanzan diversos órganos, fundamentalmente hígado, pulmones, sistema nervioso central, corazón y ojos (Tomada de <http://www.cdc.gov>).

1.7.7 *Ascaris suum*

Es un nematodo que pertenece a la familia *Ascarididae* en la cual se encuentran *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, *Baylisascaris procyonis* por citar algunos. Es una especie de distribución cosmopolita y se encuentra en el intestino delgado de cerdos produciéndoles ascariosis provocando afecciones graves en vías pulmonares. Este nematodo es alargado, cilíndrico, con líneas laterales que recorren longitudinalmente todo el cuerpo. Está provisto de 3 labios bien diferenciados que poseen diminutos dientes (Beaver *et al.*, 2003). Cada labio tiene lateralmente pequeñas papilas gemelas y, localizada centralmente, una pequeña cavidad bucal de forma triangular. Los gusanos macho miden entre 15 a 31 cm de largo por 2 a 4 mm de ancho y se diferencian de la hembra porque su extremo posterior está curvado hacia la porción ventral (Schimidt *et al.*, 2005; Tay, 1993; figura 17), donde se encuentran dos espículas quitinosas y retráctiles que le sirven para la copulación, los órganos genitales desembocan con el intestino en la cloaca (Botero y Restrepo, 2004). La hembra mide de 20 a 49 cm de longitud por 3 a 6 mm de ancho, posee dos ramas uterinas que desembocan en la vagina, la cual se comunica con la vulva, localizada entre el tercio anterior y medio del cuerpo. Los gusanos adultos no poseen órganos de fijación pero viven en la luz del intestino delgado debido a que se sostienen contra las paredes del intestino delgado mediante la capa muscular que existe debajo de la cutícula (Beaver *et al.*, 2003).



Figura 17. **Hembra y Macho de *Ascaris suum***. La fotografía muestra dos gusanos. En la izquierda se observa un gusano hembra con sus extremos romos y redondeados, mientras que en la derecha de la fotografía, se muestra un gusano macho, el cual presenta un extremo curvo (Tomada de <http://parasitology.cvm.ncsu.edu/quiz/swine/nema/swinenemquizAQ.php>).



Ascaris suum posee similitud antigénica entre parásitos de la familia *Ascarididae* como *Ascaris lumbricoides*, que ha sido ampliamente registrada en artículos científicos de Loreille y Bouchet, (2003), Marquardt *et al.*, (2000), Yoshihara *et al.*, (2008), Martínez-Barbosa *et al.*, (2000). Por lo que ha llegado a utilizarse este nematodo como fuente de antígeno para la búsqueda de anticuerpos contra antígenos que pudieran evidenciar contacto con ascáridos, sin ninguna otra especificación, buscando en el caso de los prociénidos con ayuda de este modelo un posible contacto con *Baylisascaris procyonis* que es el ascárido que se ha reportado en ellos.

CICLO DE VIDA

Este ciclo se inicia cuando los gusanos adultos se encuentran en la luz del intestino delgado (figura 18). Luego de que la hembra es fecundada, aproximadamente a los 50 a 60 días después de la infección, deposita huevos no embrionados que son eliminados con la materia fecal (Marquardt *et al.*, 2000). Los cuales son altamente resistentes. No obstante, el calor y la desecación los destruyen en pocas semanas.

Cuando los huevos son ingeridos, los huevos llegan al intestino donde factores como el pH y la temperatura ablandan la capa externa y estimulan la actividad de las larvas que emergen de los huevos que son las larvas de segundo estado de desarrollo (L2) (Geenen *et al.*, 1999).

Estas larvas atraviesan la pared del ciego y la parte superior del intestino grueso (Murrell *et al.*, 1997), para seguir una migración tisular. La mayoría alcanzan vía sistema porta-hepático, el hígado, aunque algunas, siguen una vía linfática, llegan a los ganglios mesentéricos y otras, pueden encontrarse ectópicamente en la cavidad peritoneal y otras localizaciones (Beaver *et al.*, 2003).

Llegan al hígado, y no se fijan en un solo sitio, sino que se desplazan causando grandes daños a medida que lo hacen en el tejido hepático. Tras una primera muda endógena se transforman en larvas de tercer estado (L3) a los 4 ó 5 días post-infección. De aquí pasan, vía sanguínea, al corazón para alcanzar el tejido pulmonar en 5 ó 6 días más; tras una 3ª muda se transforman en larvas de cuarto estado (L4). Estas atraviesan los capilares sanguíneos y migran lentamente desde los alvéolos a los bronquiolos, bronquios y, finalmente a la tráquea, teniendo lugar el pico de esta migración a los 12 días post-infección.

A partir de aquí las larvas son deglutidas y llegan al intestino entre 14 y 21 días después de la infección. En ésta, su ubicación final, mudan al estado adulto al mes de ser ingeridas.

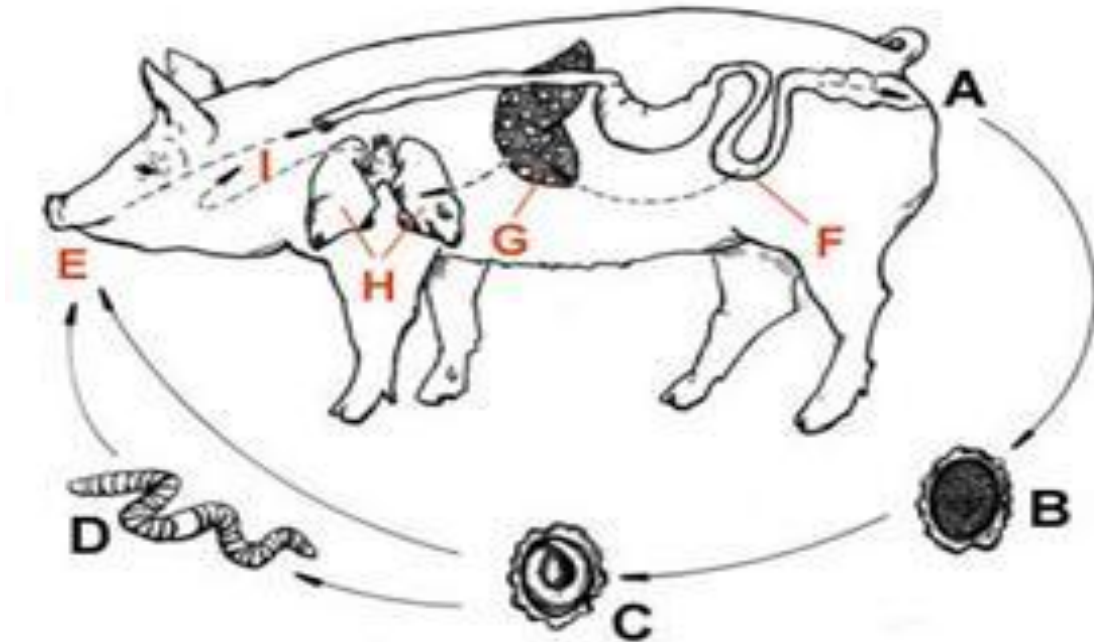


Figura 18. **Ciclo de vida de *Ascaris suum***. La hembra de *Ascaris* produce en el intestino delgado huevos no embrionados que elimina por materia fecal (A-B). Las larvas infectantes contaminan el suelo, los alimentos, el agua, y los pastos de muchas explotaciones porcinas. Tras su ingestión y en condiciones favorables de humedad y temperatura, las larvas eclosionan a L2 que penetran en el intestino delgado y llegan al hígado a través del torrente sanguíneo (G). Las larvas migran a través del parénquima hepático, mudan a L3 y migran a los pulmones (H). Salen a los alvéolos, ascienden hasta los bronquios y la tráquea, mudan a L4, alcanzan la faringe, son deglutidas y vuelven al intestino delgado. En su ubicación final en la cual mudan a adultos al mes de ser ingeridas (I) (Tomado de <http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uv7articulos/articporc>).

1.8.8 *Trichinella spiralis*

El nematodo *Trichinella spiralis* pertenece a la familia *Trichinellidae* es el parásito causante de la triquinelosis la cual es una zoonosis cosmopolita, causada por la larva muscular (LM; figura 19) que se puede transmitir entre el humano y los animales vertebrados; las principales fuentes de infección humana son la carne de cerdo y sus derivados, así como carne de otros animales peridomésticos, como caballos, jabalíes, perros, morsas, zorros entre otros.

La larva de estado dos o juvenil 2, también conocida como larva infectiva o muscular (LM) se localiza en el músculo esquelético del hospedador y mide aproximadamente 1.2 mm de longitud por 40 μm de diámetro presenta cuerpo cuticular, abertura oral, esófago, anillo nervioso, esticosoma, intestino medio, posterior y cloaca.

El esticosoma está en la parte posterior, después del esófago granular, cuyas células poseen gránulos secretorios altamente antigénicos que descargan en la luz del esófago.

Compuesto por 50 a 55 esticocitos que son células discoides cerca de la región media y se encuentra rodeada de una cápsula de colágena tipo IV y tipo VI, formando una unidad hospedadora llamada célula nodriza.

Esta estructura se encuentra rodeada de un plexo de vénulas formando por una acción génica provocada por el parásito; al parecer, estas vénulas tienen la finalidad de eliminar los desechos metabólicos, así como de proveer nutrientes. Se ha argumentado que la célula nodriza protege al helminto del ataque del sistema inmune del hospedador y le confiere resistencia al congelamiento (Despommier, 1983).



Figura 19. **Larva muscular de *Trichinella spiralis***. Tomada de la digestión enzimática de rata infectada de manera experimental durante la realización de este trabajo. Donde se observan las larvas totalmente liberadas del músculo esquelético debido a la liberación de su célula nodriza. Escala = 100 μ m, observadas en aumento de 40x..Foto tomada durante la realización de este proyecto.

La triquinelosis es un problema de salud pública en el mundo (Pozio, 2001; Dupouy – Camet, 2000). De hecho en los últimos 10 años ha habido un aumento en la prevalencia de la infección entre los cerdos domésticos y animales silvestres, por consiguiente un aumento entre los humanos (Murrell y Pozio, 2000).

CICLO DE VIDA

Este parásito intracelular lleva a cabo todo su desarrollo en un solo hospedador, el ciclo de vida es directo (figura 20) y presenta dos fases de desarrollo, una entérica, donde el gusano adulto invade las células columnares epiteliales del intestino delgado y para llegar al estado adulto, la larva pasa por cuatro mudas (denominadas como L2, L3, L4 y L5). La segunda fase es parenteral, e incluye la migración de la LRN por el sistema circulatorio y el establecimiento de la LM en el músculo esquelético (Grencis et al., 1985; Beaver, 2003).

El ciclo inicia con la ingestión de tejido muscular infestado con la LM, que al pasar por el estómago se libera de la célula nodriza por acción del ácido clorhídrico y pepsina del jugo gástrico. Llegando al duodeno, las LM comienzan su desarrollo pasando rápidamente por cuatro mudas, conocidas comúnmente como L2, L3, L4 y L5 para convertirse en gusano adulto en un lapso de 36 a 48 horas (Beaver, 2003).

Una vez convertidos en adultos copulan y los machos son expulsados del intestino coincidiendo esto con accesos de diarrea. Las hembras fecundadas migran e invaden el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado, ya que son “activadas” por una combinación de bilis y proteasas (tripsina y quimiotripsina) además del ambiente provisto por el pH básico (Beaver, 2003; Stewart *et al.*, 1987), donde entran en una fase de incubación que dura de 8 a 16 horas.

Durante las primeras 48 horas de infección *T. spiralis* induce cambios en el nicho entérico los que presumiblemente favorecen la sobrevivencia del parásito, facilitando su maduración y reproducción (Russell *et al.*, 1987). Después de cinco días post infección, comienza la liberación de las larvas recién nacidas a la linfa, pasando hacia el conducto torácico y siendo dispersadas por sangre a todo el organismo, teniendo especial tropismo por el tejido muscular esquelético. Hasta alcanzar 1mm de largo quedando encapsuladas en esta localización.

Para cerrar el ciclo se requiere que las masas musculares del individuo infectado sean consumidas por otros hospedadores.

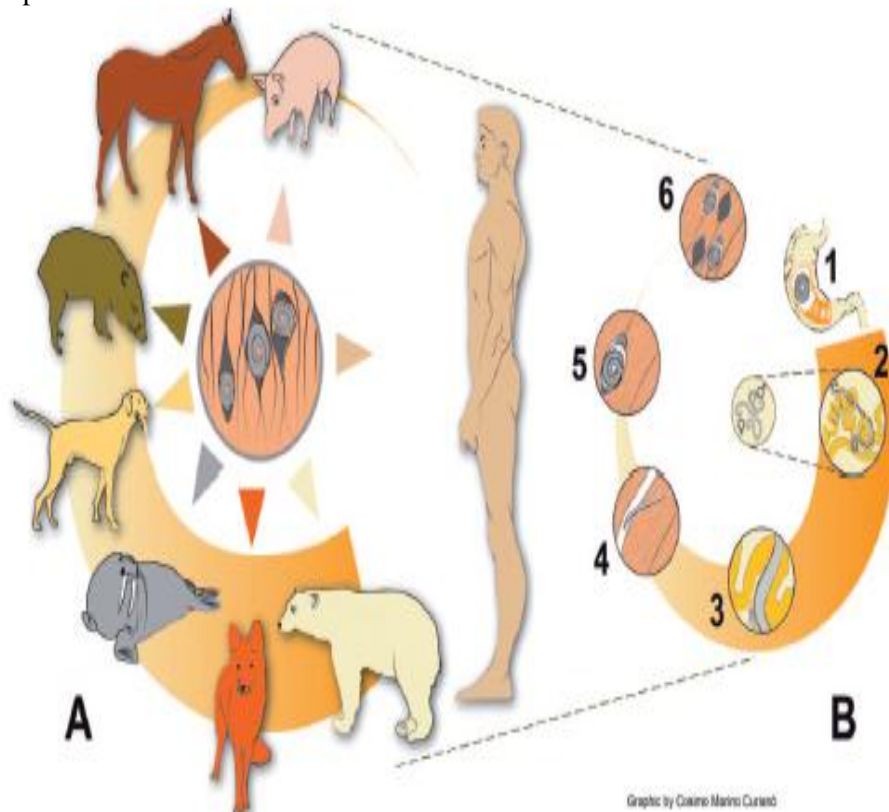


Figura 20. Ciclo de vida *Trichinella* sp. Las principales fuentes de infección de triquinelosis en humanos son cerdos, caballos, jabalíes, perros, morsas, zorros y osos, los cuales albergan en el músculo esquelético a las LM (A). Durante la fase enteral (B), el tejido muscular es digerido en el estómago, y las LM son liberadas (1); las LM penetran en la mucosa intestinal del intestino delgado y llegan a la fase adulta en las 48 horas PI, dando lugar a machos y hembras (2); a partir del quinto día PI y hasta la segunda semana PI, las hembras liberan LRN en los vasos linfáticos (3). En la fase parenteral, las LRN llegan al músculo estriado y penetran activamente en la célula muscular (4), la larva crece hasta desarrollarse como LM, originando de esta manera la fase infectiva (5). (Tomada de Gottstein *et al.*, 2009).



2. JUSTIFICACION

En la actualidad, los prociñidos semi cautivos que habitan el Parque Museo “La Venta” en Tabasco han modificado sus hábitos adaptándose a las condiciones existentes en el entorno, formando parte del ecosistema urbano, primordialmente de algunas áreas verdes y recreativas de la Ciudad de Villahermosa. El efecto de la urbanización y los diversos factores que esta conlleva pueden favorecer el contacto y diseminación de agentes patógenos al ser humano. Ya que el control parasitológico en un zoológico es un aspecto importante para el cuidado preventivo de la salud animal, al igual de quien está en contacto con ellos, particularmente en zoológicos de clima cálido y tropical se presenta un elevado índice de enfermedades emergentes provenientes de animales silvestres en cautiverio, el estudio de las mismas y sus patógenos cobra relevancia zoonótica en el estudio de este parque ya que no existen antecedentes en este tema. La búsqueda de agentes zoonóticos en la fauna silvestre es un marcador para determinar los factores de riesgo asociados a la salud pública local. Una de las herramientas de mayor uso en la actualidad es la determinación de anticuerpos contra helmintos parásitos. Con la finalidad de llevar al cabo el inmunodiagnóstico para la determinación de las familias de helmintos que pudieran parasitar los prociñidos, para realizar el diagnóstico serológico de helmintos en este trabajo se utilizaron como modelo los antígenos de *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis* con la finalidad de obtener posibles reacciones cruzadas que pudieran evidenciar contacto con los helmintos más cercanos de manera filogenética, y simultáneamente, se buscó identificar la presencia de anticuerpos contra bacterias asociadas al síndrome febril, usando como marcadores antígenos febriles que se usan para detectar anticuerpos en suero contra *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Brucella* y *Rickettsia* (reacción cruzada con *Proteus OX-19*), haciendo uso de la aglutinación con reactivos comerciales.

La información obtenida del diagnóstico de enfermedades parasitarias y bacterianas en este proyecto puede ser utilizada como una herramienta para la elaboración de programas de manejo preventivo de infecciones en los animales del parque y de quien está en contacto con ellos.



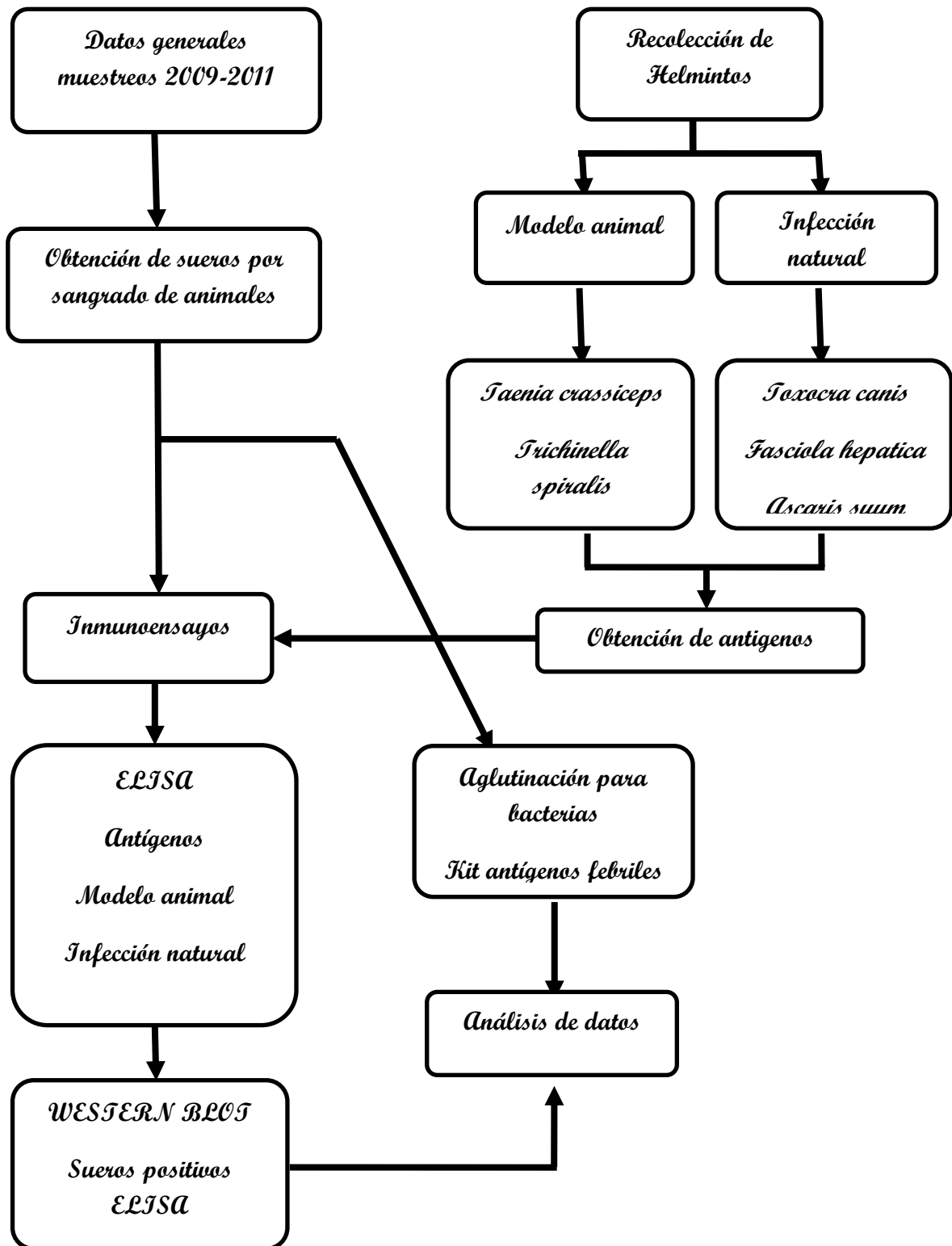
3. OBJETIVO GENERAL

Buscar la presencia de anticuerpos contra bacterias y helmintos tisulares en sueros de coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*) de libre desplazamiento en el Parque “La Venta” en Villahermosa, Tabasco.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener muestra de sangre de coatíes y mapaches mediante la captura de los animales en el Parque La Venta de Tabasco, por un periodo de tres años para búsqueda de anticuerpos en suero.
- 2.- Preparar antígenos de helmintos tisulares obtenidos de infecciones naturales (*Toxocara canis*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepatica*) y experimentales (*Taenia crassiceps*, *Trichinella spiralis*) los cuales serán utilizados en el inmunodiagnostico.
- 3.- Estandarizar el ensayo inmunoenzimático para determinar las condiciones óptimas de dilución de suero y conjugado en estas especies animales.
- 4.- Determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos de *Ascaris*, *Fasciola*, *Toxocara*, *Taenia* y *Trichinella* como indicadores de infección por grupos de parásitos.
- 5.- Determinar la presencia de anticuerpos contra las bacterias *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Brucella abortus* y *Rickettsia sp.* (reacción cruzada con *Proteus OX-19*) usando un “kit” comercial para reacciones febriles.

5. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO





6. MATERIALES Y METODOS

6.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS Y PROCESAMIENTO PARA OBTENCIÓN DE SUEROS.

Se realizaron seis capturas de animales en el periodo comprendido entre 2009 y 2011 (verano e invierno en cada año). Las capturas de mapaches se realizaron con trampas tipo Tomahawk colocadas durante la noche empleando como cebo sardinas. Los coatíes se capturaron mediante el uso de dardos anestésicos (ketamina-xilacina). Todos los animales fueron sedados y se les tomó una muestra de sangre de aproximadamente 5 mL por punción en la vena yugular. Posteriormente se tomaron datos generales que consistieron en edad, y sexo. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se separó para obtener los sueros. La obtención de las muestras se realizó en el Estado de Tabasco por personal capacitado y luego fueron trasladadas al laboratorio.

6.2 ANTÍGENOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE *Trichinella spiralis* y *Toxocara canis*.

Trichinella spiralis (cepa MSUS/ME/92/CM-92 Origen mexicana).

Los hospedadores, ratas de la cepa Wistar hembras de 6 semanas de edad previamente infectadas en el bioterio del InDRE. Se infectaron oralmente con 23 LM por gramo de peso, equivalente a $7,000 \pm 125$ LM, suspendidas en un amortiguador de fosfatos (0.01 M) adicionado con NaCl (0.15M) a pH 7.2 (PBS) y se administraron con una micropipeta. Cada rata recibió 0.15 mL. A las seis semanas de infección, se sacrificaron, utilizando vapores de éter según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, se retiró la piel, vísceras y cabeza, se colectó el músculo esquelético.

Se lavó con agua corriente para retirar la sangre, luego se seccionó en fragmentos pequeños y cada gramo de carne se mezcló con 0.1 g de pepsina, 0.1 mL de HCl con una pureza de 38% (densidad 1.19 a 25°C) y 10 mL de agua destilada.

Posteriormente se realizó digestión enzimática para la recuperación de las larvas con agitación constante por 4 horas a 37°C. Al término de las 4 horas la solución de digestión se filtró con una doble malla de gasa de pañalina colocada sobre la boca de un embudo de separación y se dejó sedimentar por una hora.

El botón (de color rosa, figura 32), constituido por las larvas, se extrajo en un tubo de centrifuga de 15 mL y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con NaCl 0.015 M pH 7.2 (PBS); para descartar el sobrenadante, se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Con una pipeta Pasteur se extrajo el excedente de tejido.



Finalmente, las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 60%), para limpiarlas de los restos de tejido. Las larvas se obtuvieron de la interfase de 20-40% y se repitieron los lavados con PBS para eliminar el exceso de dextrosa y se resuspendieron en 10 mL de PBS.

Se tomaron 10 μ L para contarlas, el promedio de tres cuentas se interpoló para conocer el número total de larvas.

Para obtener los productos de excreción y secreción de la larva muscular, se hicieron cinco lavados con PBS estéril que contenía una mezcla de antibióticos (500 U/mL de penicilina, 500 μ g/mL de estreptomicina de PBS y Fungizona [1mg/mL]; (BioWhittaker, , MD, USA), los lavados se hicieron centrifugando a 1,613 gravedades durante 5 minutos a temperatura ambiente y descartando el sobrenadante en cada ocasión. Después, se hicieron dos lavados con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) que contenía 2 gramos de bicarbonato de sodio, 2 gramos de HEPES y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina y 0.25 μ g/mL de fungizona ajustando el pH a 7.2. Las larvas se cultivaron en frascos para cultivo de 15 mL (Corning®), a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 48 horas en proporción de 10,000 larvas por cada 100 μ L de medio. El cultivo se revisó a cuatro aumentos en microscopio invertido diariamente para verificar que no existiere contaminación; cada 24 horas el medio de cultivo se recuperó según vire de naranja a ámbar y se sustituyó con medio nuevo. La recuperación de medio se realizó un par de veces dependiendo de la motilidad e integridad de las larvas.

El medio recuperado se juntó y se concentró por ósmosis contra azúcar sólida, luego se dializó contra PBS por 18 horas. En este proceso se empleó membrana de celulosa (Spectra/Por®, California, USA) de poro molecular 6000 a 8000 Da, previa a su utilización, la membrana se hirvió en agua destilada para eliminar la glicerina (humectante) y algunos compuestos sulfurosos que puedan interferir con el uso del dializado, después del tratamiento y sin dejar que la membrana se seque, se amarra un extremo del tubo con hilo de algodón, se vertió por el otro extremo la solución a dializar y se amarra el otro extremo formando una “salchicha.”

La “salchicha” se colocó dentro de un recipiente que contenga 2 L de la solución amortiguadora PBS. La diálisis se mantuvo en agitación y a 4°C por toda la noche, al día siguiente se hizo un cambio de PBS y se agitó a 4°C por 4 horas, con ayuda de una jeringa se extrajo la solución dializada. La concentración de proteínas se determinó por el método colorimétrico de Bradford (Bio Rad®, California, USA.). La solución se almacena a -20°C.



Finalmente, por cada 850 μL de sobrenadante de cultivo se adicionó 50 μL de N-Tosil-L-fenilamina clorometil-cetona (TPCK; 1 mg/mL en metanol), 50 μL de N- α -p-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK 1 mg/mL en agua), 40 μL de sal sódica de p-hidroximercuribenzoato (PHMB 0.04 % en NaOH 2 N), 6 μL (Fenil metilsulfolnilfluoruro (PMSF 0.06% en isopropanol) y 4 μL de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 1M) como inhibidores enzimáticos. El antígeno se distribuyó en alícuotas pequeñas (0.5 mL) empleando criotubos. Cada criotubo, se etiquetó con fecha, antígeno, concentración y quien lo realizó. El antígeno se almacena a -20°C .

Toxocara canis (Infección natural)

Los gusanos adultos se obtuvieron de intestino delgado de perros de entre 2 y 3 meses de edad, respectivamente, los cuales estaban sujetos al programa de control de fauna no deseada del centro de control canino de la delegación Iztapalapa.

Para obtener el intestino del cadáver del cachorro, se hizo una pequeña incisión sobre la línea media ventral y se extrajo el asa intestinal que forma parte del intestino delgado. Con unas tijeras se abrió el intestino longitudinalmente. Los parásitos se extrajeron con pinzas, y se colocaron en un recipiente con agua cuya temperatura se encontró entre $30-40^{\circ}\text{C}$, lavándose por medio de agitación. Los gusanos se lavaron con PBS cuya temperatura se encontraba entre $30-40^{\circ}\text{C}$ durante 5 veces con agitación manual. Posteriormente se lavó cada gusano, nuevamente mediante agitación manual 5 veces con PBS estéril con antibióticos (por cada 100 mL de solución de PBS, se agregó 1 mL de solución de antibióticos cuya concentración fue de 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B).

Para obtener los productos de excreción y secreción del gusano adulto se realizaron los mismos lavados que en el caso de *Trichinella spiralis* pero con los gusanos de *Toxocara* y posterior a eso se cultivaron todos los helmintos en frasco para cultivo de 15 mL (Corning®), a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO_2 durante 48 horas. El cultivo se revisó a cuatro aumentos en microscopio invertido diariamente para verificar la ausencia de contaminación; cada 24 horas el medio de cultivo se recuperó según el vire de naranja a ámbar y se sustituyó con medio nuevo.

Por último se siguió con la concentración y diálisis de lo que se recuperó del medio como se explicó anteriormente con *Trichinella spiralis*, se cuantificaron las proteínas del antígeno, se adicionaron inhibidores enzimáticos y se distribuyó en alícuotas pequeñas (0.5 mL) empleando criotubos. Cada criotubo se etiquetó con fecha, antígeno, concentración y quien lo realizó, para su almacenamiento a -20°C .



6.3 EXTRACTO TOTAL ANTIGÉNICO DE *Fasciola hepatica* y *Ascaris suum*

Se obtuvo un hígado infectado del rastro municipal de Pachuca, Hidalgo. Para la extracción de los parásitos adultos, el hígado se abrió longitudinalmente y se expusieron los conductos biliares, buscando adultos de *Fasciola hepatica*, los cuales se extrajeron cuidadosamente y se colocaron en una caja Petri con PBS, se realizaron 5 lavados con PBS. Se trabajó con gusanos cuyo intestino se encontró libre de detrito celular (limpio), los ejemplares se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los gusanos adultos de *Ascaris suum* se obtuvieron de intestino delgado de cerdo de entre 1 y 2 meses de edad. Los parásitos se extrajeron cuidadosamente y se colocaron en una botella con PBS, al llegar al laboratorio se realizaron 5 lavados con PBS estéril y 5 lavados adicionales con PBS estéril adicionado con una solución de antibióticos (por cada 100 mL de solución de PBS, agrego 1 mL de solución de antibióticos cuya concentración fue de 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. El sobrenadante se decantó y los gusanos se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para preparar los antígenos, los gusanos se descongelaron, se utilizaron 15 gusanos de *Fasciola hepatica* y, un gusano hembra y uno macho de *Ascaris suum* para la preparación de su respectivo antígeno. Los volúmenes siguientes se agregaron para cada mililitro de antígeno que se deseó preparar (en este caso fueron 3 mL). Los gusanos se colocaron en un mortero sobre baño de hielo, que contenía 658 μL de Tris-base 10 mM. Inmediatamente se agregaron los inhibidores enzimáticos de la siguiente manera, 50 μL de N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona) (TPCK; 1 mg/mL diluido en metanol), 50 μL de N- α -p-tosil-L-lisina clorometil-cetona (TLCK 1 mg/mL diluido en agua), 40 μL de Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato (PHMB; 0.04% diluido en $\text{N}_2\text{OH}_2\text{H}$), 6 μL de Fenil metilsulfoilnilfluoruro (PMSF; 0.06% diluido en isopropanol) y 4 μL de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA; 1M diluido en agua).

Se procedió a triturar a los gusanos durante 15 minutos manteniendo el mortero en el baño de hielo. Se agregó 192 μL de Desoxicolato de sodio (DOC al 1%). Siguió triturándose durante 15 minutos más y se reposo el homogeneizado durante 20 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se homogeneizó nuevamente 15 minutos sin retirar el baño de hielo. Se recuperó el homogeneizado y se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recolectó el sobrenadante y se dializó exhaustivamente toda una noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación constante contra PBS utilizando una membrana con poro molecular de 6000 a 8000 Da. Al día siguiente se hizo un cambio de PBS y se continuó la diálisis por dos horas más. Las proteínas se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford (BioRad[®])

El volumen final de antígeno se suplemento con inhibidores enzimáticos según lo descrito anteriormente y se distribuyó en alícuotas pequeñas (0.5 mL) empleando criotubos.



Cada criotubo se etiquetó con fecha, tipo de antígeno, concentración de proteínas y quién lo preparó. Se guardó a -20°C hasta su uso.

6.4 FLUIDO VESICULAR DE *Taenia crassiceps*

Taenia crassiceps:(cepa ORF. Origen mexicana)

El parásito se propagó en ratones hembra de la cepa Balb/c mediante la infección con 50 cisticercos en vía peritoneal durante 8 semanas. Se realizó la eutanasia usando vapores de éter según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, se introdujo en la cavidad peritoneal 5 mL de PBS utilizando una jeringa y se dio un pequeño masaje, se hizo una incisión sobre la línea media con un bisturí y con una jeringa (sin aguja) se succiono el líquido para extraer los cisticercos, cuidando no tener contacto con las vísceras.

Se obtuvieron los metacestodos y se colocaron en una caja Petri con PBS Se lavaron por decantación 7 veces con PBS suplementado con antibióticos (por cada 100 mL de solución de PBS, se agrego 1 mL de solución de antibióticos cuya concentración fue 100 U/mL de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B, se decantaron y se congelaron a -20°C .

Para la obtención del fluido vesicular, se utilizaron metacestodos recién obtenidos e inmediatamente se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajo el sobrenadante, que correspondió al fluido vesicular y el sedimento que correspondió a los escólices y pared de la vesícula.

El sobrenadante se dializó en PBS a 4°C durante 24 horas en agitación. Al terminar la diálisis se cuantificaron proteínas por el método colorimétrico de Bradford (BioRad®). El volumen final de antígeno se suplementó con inhibidores enzimáticos, según lo descrito anteriormente y se distribuyó en alícuotas pequeñas (0.5 mL) empleando criotubos. Cada criotubo se etiquetó con fecha, tipo de antígeno, concentración de proteínas y quién lo preparó. Se guardó a -20°C hasta su uso.

6.5 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Se realizó de acuerdo al protocolo descrito por de-la-Rosa y Gómez-Priego, (2000). Se manejó una hoja de control donde se especificaron cuales pozos de poliestireno de fondo plano de la placa de ELISA (Corning® - Costar 3590, Hercules Ca., USA) serían los sitios de reacción para los testigos positivos, testigos negativos así como de las muestras problema (las muestras se colocaron por duplicado).



Las placas se sensibilizaron agregando 50 μL /pozo de los antígenos preparados a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el antígeno se diluyó con una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. La placa de ELISA se cubrió con Parafilm® (Chicago, Illinois) y se incubó a 4°C durante una noche.

La solución de antígeno se eliminó virtiendo el contenido de los pozos y se secó el exceso de antígeno sobre una gasa. La placa se lavó 3 veces con 200 μL /pozo con una solución lavado PBS adicionado con Tween (PBS-T) 20 al 0.05 %. Los lavados se realizaron en un lavador de placas automático. La placa se bloqueó con 200 μL /pozo con una solución de leche semidescremada al 5 % en PBS-T. La placa se incubó una hora a 37°C. Después de transcurrido éste tiempo la placa se lavo 3 veces como en el paso anterior. Se diluyeron las muestras 1:400 en PBS-T, se colocó 50 μL /pozo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo, se agregaron 50 μL /pozo de proteína A/peroxidasa diluido en solución amortiguadora de fosfatos (1:1000) y la placa se incubo a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se realizaron los lavados correspondientes.

Se adicionaron 50 μL /pozo del sustrato 4 μg de orto- fenilendiamina, 10 mL de Buffer Citrato-Fosfatos y 12 μL de H_2O_2 al 3% el cual se preparó al momento de usarlo. Se cubrió la placa de la luz, y se observó en intervalos hasta que los sueros negativos, comenzaron a colorearse de un color amarillo paja. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50 μL /pozo de una solución de H_2SO_4 2N. La lectura del resultado se llevo a cabo en un lector de ELISA a 490 nm.

6.6 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

Determinación del patrón electroforético

La determinación del patrón electroforético se realizó de acuerdo al protocolo descrito por de-la-Rosa y Gómez-Priego, (2000). El patrón electroforético se determinó a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %.

ELECTROFORESIS

El sistema de geles se preparó con una cámara para electroforesis mini-protean II (BioRad®), empleando cristales de 7.3 x 10.2 cm y separadores de 1.5 mm de espesor.

1. El gel separador (acrilamida 12 %) se preparó mezclando en este orden. 5.5 mL de una solución de acrilamida al 29.2 % que contienen n-n'-metilen-bis-acrilamida al 0.8%, 3 mL de una solución de tris hidroximetil aminometano (Tris-base) 2M pH 8.8, 0.13 mL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 5.25 mL de agua destilada.



Posteriormente se agregaron 0.50 mL de persulfato de amonio (10 mg/mL) y 0.030 ml de n,n,n',n'tetrametiletilendiamina (TEMED); después de mezclar vigorosamente, se colocaron 10 mL de solución entre los dos cristales de la cámara y se dejó polimerizar.

2. El gel concentrador (acrilamida 5 %) se preparó mezclando, en este orden, 1.17 mL de una solución de acrilamida al 30% que contiene n-n'-metilen-bis-acrilamida al 0.8 %, 0.22 ml de una solución de tris hidroximetil aminometano hidrocloreto 2 M pH 6.8 (Tris-HCl), 0.03 ml de SDS al 10% y 3.83 ml de agua destilada.

Posteriormente se agregó 0.20 mL de persulfato de amonio (10 mg/mL) y 0.010 mL de TEMED; después de homogeneizar, la mezcla se colocó sobre el gel separador, evitando la formación de burbujas. Se colocó un peine de teflón con dos carriles, uno para contener el antígeno y otro para colocar el marcador de peso molecular.

3. Después de la polimerización se quitó el peine y se eliminó el exceso de solución no polimerizada con agua. Antes de poner las muestras se secaron los carriles con papel filtro grueso.

4. Se emplearon 100 µg de antígeno diluido 1:2 en solución para desnaturalizar proteínas [1mL de SDS 10%, 7.4mg de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 1 mL de glicerina, 250 µL de TRIS-HCl 2M, pH 6.8, 1 mg de azul de bromofenol y agua destilada para completar 10mL]. Antes de usarse, a cada mililitro de la solución para desnaturalizar proteínas se le adicionaron 100 µL de 2-mercaptoetanol.

La mezcla antígeno-solución para desnaturalizar proteínas, se llevó en baño maría durante 10 minutos. El marcador de peso molecular se preparó de acuerdo a su instructivo (Bio-Rad®, Lab.).

5. La electroforesis se efectuó en presencia de un litro de solución de TRIS-base 20 mM, pH 8.8 g; glicina, 150mM; SDS 10%, 8mL, aplicando 180 volts durante 70 minutos en cama de hielo o cuando el color de la solución para desnaturalizar proteínas alcanzó el borde de los cristales. Una vez que terminó el corrimiento electroforético el gel se separó de los cristales y se sumergió en una solución de Azul de Coomassie al 0.2 % durante 2 horas. El gel se lavó varias veces con una solución decolorante (alcohol/ácidoacético) hasta que ya no existió coloración de fondo.

ELECTROTRANSFERENCIA

Para iniciar esta técnica se emplearon geles de poliacrilamida no teñidos.

1. Se humedecieron un par de hojas de papel filtro, un par de las esponjas y una membrana de papel de nitrocelulosa (Micropore® (Delaware, USA.), con poro de 0.22 µm de 10.X 8 cm, en solución amortiguadora de transferencia pH 8.3 (Tris 0.025 M, Glicina 0.125 M, Metanol 20 %).

2. Se colocó el cassette de transferencia en posición horizontal, con la parte de color negro hacia abajo en un recipiente que contenía solución de transferencia pH 8.3. Posteriormente se colocó una fibra blanca sobre el lado negro del cassette de transferencia y sobre de esta un papel filtro.

Siguiendo se colocó el gel sobre el papel filtro con el marcador de peso molecular del lado derecho y el frente de corrimiento (línea azul) hacia abajo.

4. Con unas pinzas se colocó la membrana de papel de nitrocelulosa sobre el gel, evitando la formación de burbujas y se marcó con color azul sobre la membrana, el frente de corrimiento del gel. Se colocó el segundo papel filtro sobre la membrana de papel de nitrocelulosa y sobre de este la segunda fibra blanca (figura 21).

5. Se cerró el cassette de transferencia evitando mover las fibras. Y se colocó el este en el electrodo de transferencia y éste a su vez en la cámara de transferencia (Bio-Rad). Prosiguió a llenarse la cámara de electrotransferencia con el amortiguador de transferencia pH 8.3. Se tapó la cámara de transferencia y se conectaron los electrodos a la fuente de poder. La cámara se colocó en un contenedor con hielo para que fungiera como refrigerante durante todo el proceso.

6. Por último, las glicoproteínas se transfirieron de cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo) a 100 volts durante 1 hora a 4°C.

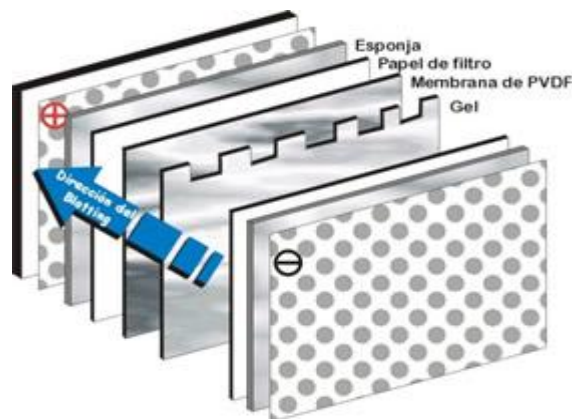


Figura 21. **Orden de colocación de los elementos para electrotransferencia.** Se esquematiza el orden de colocación de las fibras, papel filtro, NC y gel en los cassettes de plástico para la electrotransferencia (Tomada de http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Western_Blot&opc=introduccion).

Nota: Durante el proceso se checó que la temperatura durante toda la electrotransferencia no alcanzara más de 45°C, cuando se observó que la temperatura aumentaba se apagó la fuente de poder, y se esperó a que bajara la temperatura y para continuar hasta completar el tiempo requerido.

7. Al terminar la electrotransferencia, se retiró con pinzas la membrana de nitrocelulosa y se lavó con PBS pH 7.2. Se marcó en la membrana su límite superior con un lápiz de color azul.

8. Para verificar que la electrotransferencia fue adecuada se tiñó por 15 minutos la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau S (0.2 %) y se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante.

9. Se cortaron y eliminaron los extremos de la membrana (donde no hubo contacto con el gel). Por último se cortaron de la membrana los marcadores de peso molecular y se rotuló con la fecha de transferencia y el número de membrana correspondiente.
10. La membrana se bloqueó con leche descremada (5 %) –PBS-Tween 20 durante toda la noche a 4°C al día siguiente se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 y 2 lavados con PBS durante 5 minutos c/u y en agitación constante a temperatura ambiente. La nitrocelulosa se secó perfectamente y se cortó en tiras de + 0.3 cm de ancho y se marcaron en el extremo de la tira donde se encontraba el frente (figura 22).
12. Finalmente, se colocó la membrana de nitrocelulosa y el marcador de peso molecular entre papel filtro envuelto en papel aluminio. Se etiquetó con fecha, nombre del antígeno, concentración del mismo, quién lo realizó y se congeló dentro de una bolsa dentro de una bolsa de plástico a –20 °C hasta su uso.

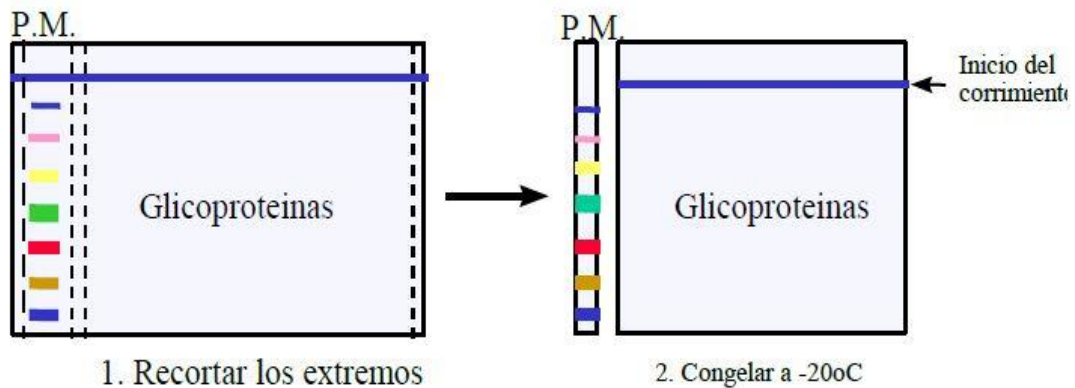


Figura 22. **Presentación final de la membrana de NC después de la transferencia.** Donde se observa el separamiento de proteínas en el carril del marcado de peso molecular y en el otro carril las glicoproteínas provenientes del antígeno que servirán posteriormente para la inmuno-electrotransferencia. (Tomada de Manual de Laboratorio de Helmintos Tisulares, Indre).

IET

Para la realización del ensayo se utilizaron placas con canales perfectamente limpias.

1. Se colocó 1 tira reactiva en cada canal y 1 mL de muestra (problema) de suero diluido 1:50 en PBS-Tween 20 0.05 % por canal.
2. En la evaluación de las muestras se agregó un testigo positivo de suero previamente evaluado por esta técnica, así como de un testigo negativo.
3. Las tiras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación constante.
4. Transcurrido el tiempo, se eliminaron las muestras biológicas y se hicieron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno con agitación continua y a temperatura ambiente.

5. Se adicionó 1ml de conjugado proteína A/peroxidasa (La dilución óptima se determinó previamente.) diluido en PBS-Tween 20 al 0.05% a cada canal e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante.
6. Se repitieron los lavados como en el paso 4
7. Se colocaron 1ml del sustrato a cada canal, el cual contenía H₂O₂ y como cromógeno 4-cloro-1-naftol. El sustrato se preparó en el momento del revelado. Se incubó a temperatura ambiente con agitación constante por 30 minutos (tiempo suficiente para observar la aparición de las bandas diagnósticas).
8. Se desechó la solución de sustrato y se hizo un lavado de 3 minutos con agua destilada con lo cual se detuvo la reacción enzimática.
9. Por último se secaron las tiras, se pegaron en la bitácora sobre un papel blanco en el orden original y se cubrieron con una mica de acetato para conservar las bandas sobre las tiras.

6.7 AGLUTINACION PARA BACTERIAS

TITULACION RAPIDA EN PLACA

Se utilizaron placas para microtitulación (Corning- Costar) para realizar este procedimiento se utilizó el “kit” comercial FEBRICLIN (BioRad®, México).

Empleando micropipetas se colocaron en 4 pozos de la placa 20 µL, 10 µL, 5 µL, 2.5µL y 1.25µL de suero y se repitió el procedimiento para un control negativo y uno positivo.

Se colocaron 12.5 µL de antígeno previamente agitado sobre cada gota de suero. Se mezcló el suero y el antígeno utilizando una varilla. Para cada dilución se empleó una varilla distinta. Prosiguió a agitarse la placa durante 2 minutos en forma circular. Y se observó la aglutinación utilizando luz indirecta sobre fondo oscuro. Este procedimiento se realizó para cada uno de los antígenos y se observó el grado de aglutinación, interpretándolo según la figura 23.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	
El grado de aglutinación se registra como sigue:	
4+	Aglutinación del 100% de los organismos
3+	Aglutinación del 75% de los organismos
2+	Aglutinación del 50% de los organismos
1+	Aglutinación del 25% de los organismos
-	Aglutinación del 0% de los organismos

Figura 23. Interpretación de resultados para aglutinación en placa. Se muestra como conforme al porcentaje de aglutinación observado se le asigna un valor como lo muestra la tabla. El punto final de la aglutinación es la máxima dilución del suero que mostro una aglutinación de 2+. (Tomado de inserto Kit Febriclin, Bio-Rad).

7. RESULTADOS

7.1 SUEROS DE COATÍES Y MAPACHES

Se obtuvieron 231 sueros, 171 de coatíes y 60 de mapaches. La figura 24 y 25 muestran el número de sueros obtenidos durante cada muestreo. El porcentaje de hembras y machos evaluados se muestra en las figuras 26 y 27 y las edades en la figura 28.



Figura 24. **Sueros de coatíes.** Se observa el número de sueros obtenidos en los 3 años de muestreos donde se obtuvieron en promedio 25 muestras por muestreo en el periodo 2009 a 2011.



Figura 25. **Sueros de mapaches.** Se observa el número de sueros obtenidos en los 3 años de muestreos donde se obtuvieron en promedio 10 muestras por muestreo en el periodo 2009 a 2011.

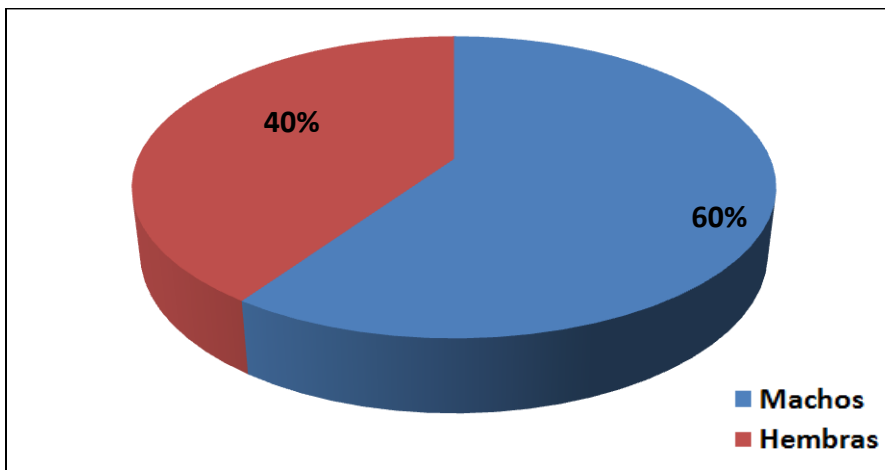


Figura 26. **Distribución por sexo de las muestras de suero de coatis.** Las muestras de suero se obtuvieron en seis muestreos diferentes durante los años 2009 a 2011. Se hicieron dos muestreos por año

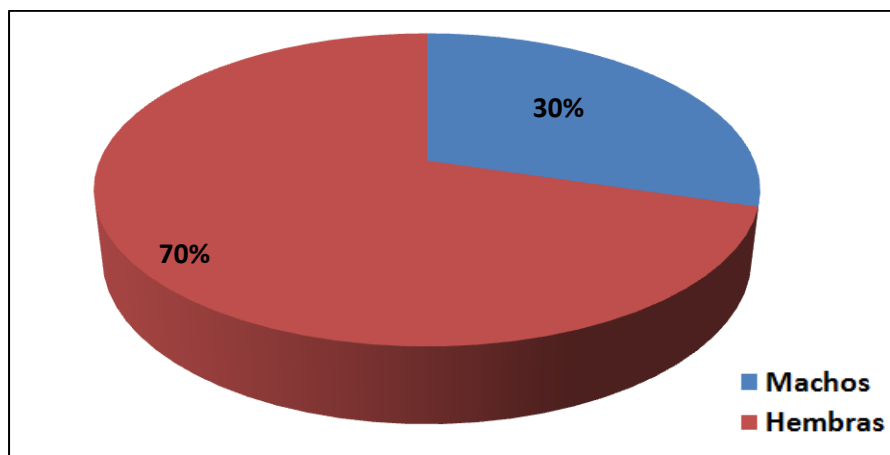


Figura 27. **Distribución por sexo de las muestras de suero de mapaches.** Las muestras de suero se obtuvieron en seis muestreos diferentes durante los años 2009 a 2011. Se hicieron dos muestreos por año.

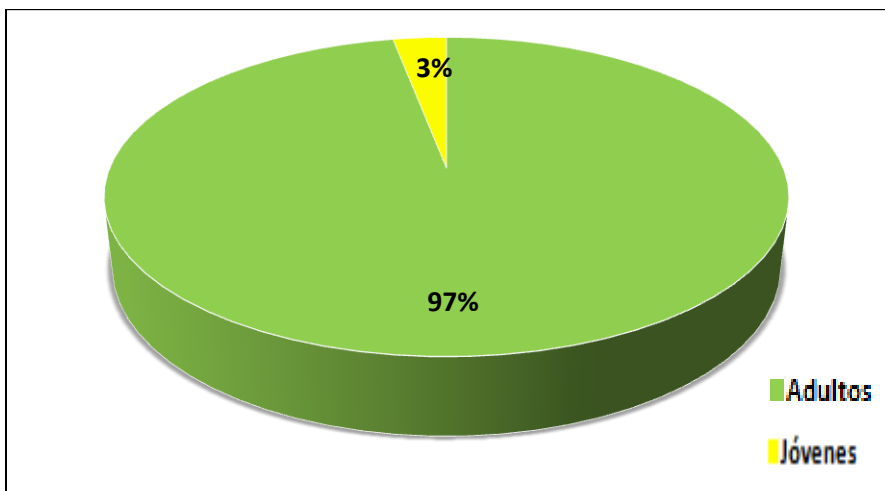


Figura 28. **Distribución por edad de los sueros obtenidos de ambas especies (coatis y mapaches) en los muestreos de 2009 a 2011.** Se obtuvieron 231 muestras de suero, de ellas 224 fueron provenientes de adultos y 7 de animales jóvenes.

7.2 OBTENCIÓN DE HELMINTOS

7.2.1 *Fasciola hepatica*

El hígado infectado (figura 29) fue donado por el rastro municipal de Pachuca, Hidalgo. Se trabajó con gusanos cuyo intestino se encontró libre de *detritus* (limpio), los ejemplares se congelaron a -20°C . El número de helmintos encontrados fue de 22.

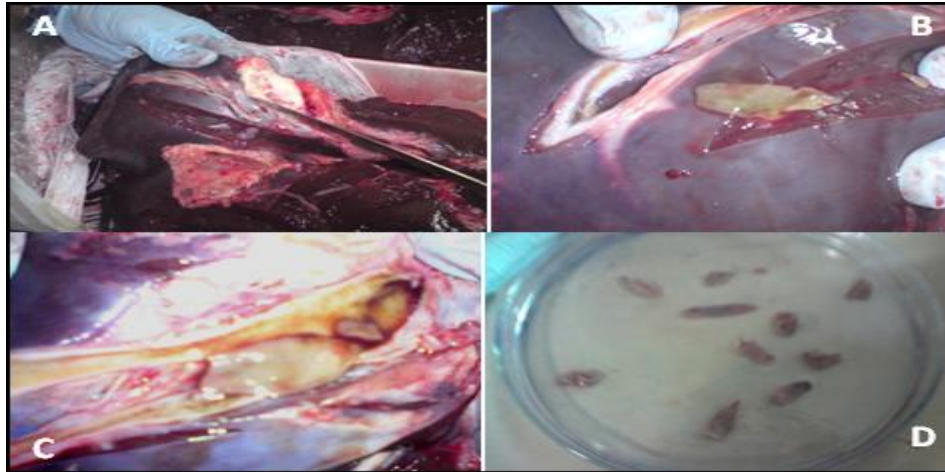


Figura 29. **Obtención de gusanos adultos de *Fasciola hepatica***. En el panel A se observa el hígado del cual se obtuvieron los gusanos adultos. En los paneles B y C se puede observar la obtención de los helmintos mediante la incisión en el hígado. Por último en el panel D se aprecian algunos de los gusanos adultos en PBS para su posterior tratamiento.

7.2.2 *Taenia crassiceps*

La cepa de *T. crassiceps* se propagó durante 8 semanas en ratones Balb/c (figura 30), al verse aumentado el tamaño de la parte ventral de los ratones infectados se extrajeron los cisticercos, de un ratón infectado se obtuvieron aproximadamente 500.

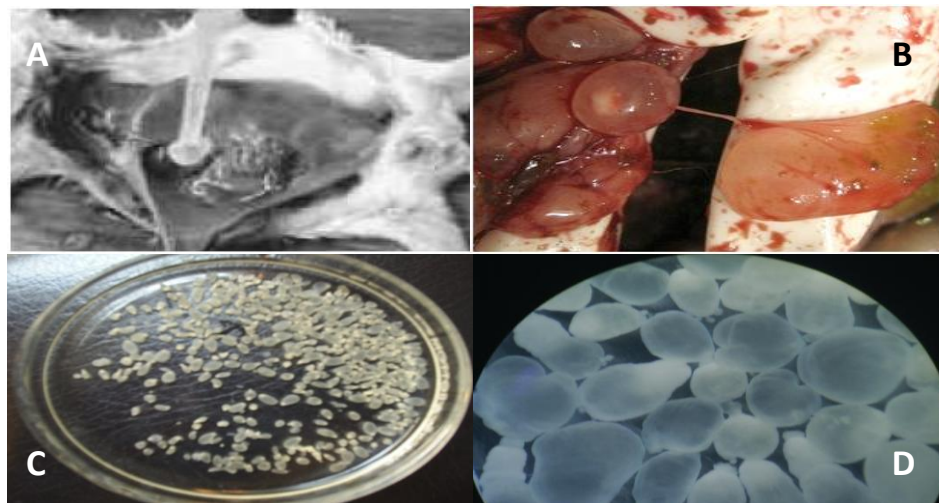


Figura 30. **Obtención de cisticercos de *Taenia crassiceps***. En el panel A se observa la disección del ratón infectado con *Taenia crassiceps* extrayéndole los cisticercos. En el panel B se observan los cisticercos obtenidos en la parte abdominal. Panel C y D muestran los cisticercos obtenidos del ratón los cuales se encuentran en PBS y a su vez la observación de estos cisticercos en microscopio óptico a 10x.

7.2.3 *Toxocara canis*

Se realizó una visita al Centro de Control Canino de la delegación de Iztapalapa con la finalidad de obtener gusanos de *Toxocara canis* a partir de perros de entre 2 a 4 meses de edad infectados naturalmente. Se obtuvieron 10 cadáveres de cachorro, éstos presentaban carga parasitaria variable pero en cada uno, en promedio se recuperaron dos parásitos por perro dando por total 13 parásitos de los cuales 6 eran machos y 7 hembras.

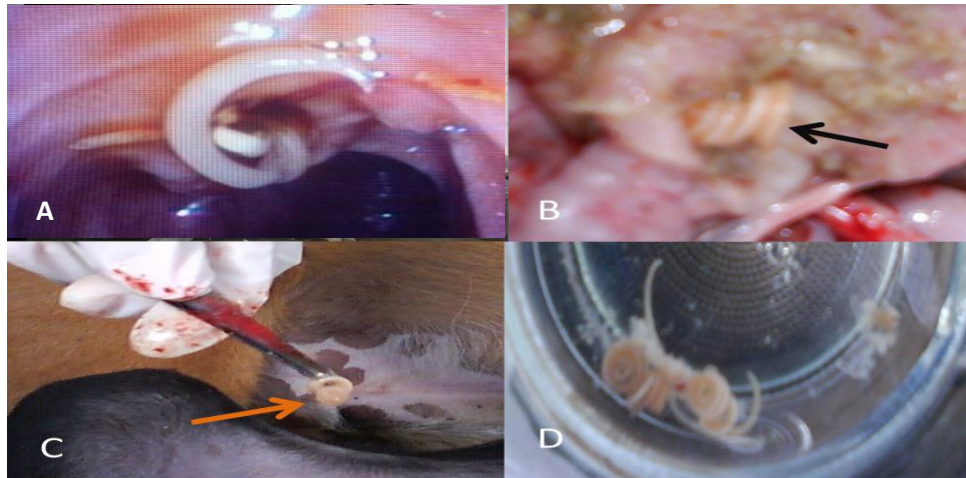


Figura 31. **Obtención de gusanos adultos de *Toxocara canis*.** En el panel A se observa un gusano adulto de *Toxocara canis* dentro del intestino delgado. En el panel B se observa un gusano saliendo de la luz del intestino delgado. En el panel C se muestra uno de los parásitos obtenidos, ya fuera de su hospedador. En el panel D se encuentran los parásitos obtenidos, depositados en PBS.

7.2.4 *Trichinella spiralis* cepa MSUS/ME/92/CM

Para determinar el número de larvas musculares (LM) obtenidas de la digestión de la carne de rata (figura 32), se tomaron 0.005 mL de una suspensión de larvas y se contaron con ayuda de un microscopio a 10 aumentos; se hicieron cinco conteos, se obtuvo el promedio y realizó una regla de 3 para conocer el número de larvas presentes en el tubo. El número de larvas obtenido fue de 252,800 larvas en una rata sometida a digestión enzimática cuyo peso fue de 190.5g.

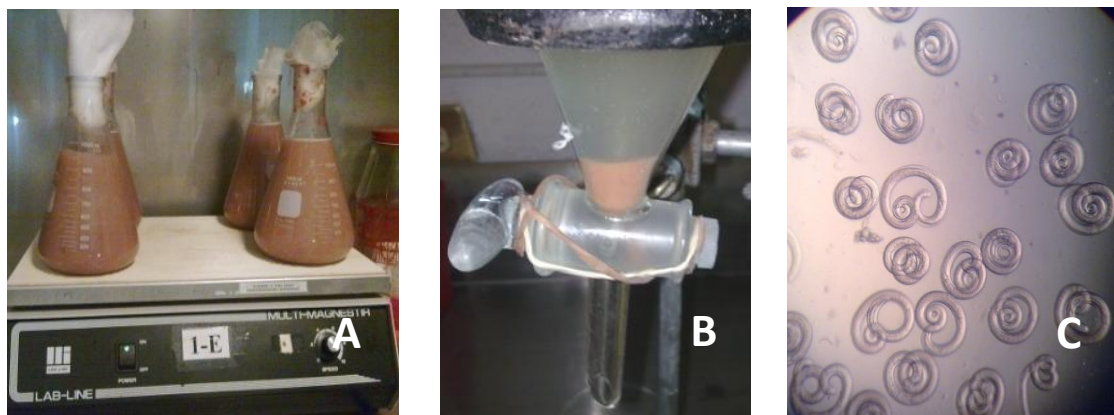


Figura 32. **Obtención de larvas musculares de *Trichinella spiralis*.** En A se observa la digestión enzimática de musculo esquelético de ratas infectadas experimentalmente. Las larvas se obtuvieron por sedimentación en un embudo de separación como un botón rosa (B). Fueron contadas con ayuda de un microscopio óptico a 40 aumentos (C).

7.2.5 *Ascaris suum*

Los parásitos de *Ascaris suum* adultos fueron recuperados del intestino delgado de un cerdo del rastro municipal de Toluca, Estado de México por el Dr. Benjamín Noguera Torres del Departamento de Parasitología de la ENCB, se obtuvieron 12 parásitos de los cuales 4 eran machos y 8 hembras (figura 33). Posteriormente cada gusano adulto fue envasado en seco en un tubo cónico de 50 mL y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.



Figura 33. **Obtención de gusanos adultos de *Ascaris suum*.** En el panel A se observan los parásitos obtenidos, algunos de los cuales tienen una longitud mayor a los 30 cm. En el panel B se muestra ambos géneros de *Ascaris suum*. En el panel C (flecha) se muestran la parte posterior de un gusano macho el cual es curvo. En el panel D (flecha) se observa la parte posterior de un gusano hembra el cual es romo y redondeado.

7.3 PREPARACION DE ANTÍGENOS Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la obtención de los distintos antígenos (excreción y secreción, extracto crudo y recuperación de fluido vesicular) de los helmintos mencionados anteriormente, se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos. Obteniéndose en el caso de los extractos totales antigénicos 3 mL de antígeno, 2mL para los antígenos de excreción y secreción y al igual 2 mL para el fluido vesicular. De cada antígeno se determinaron proteínas por el método colorimétrico de Bradford y comercializado por Bio-Rad®. Se realizó una dilución del reactivo en agua 1:5. Se preparó una solución estándar de $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de Albúmina Sérica bovina (ABS), con estas soluciones se construyó una curva tipo, y se leyó en un lector a una longitud de onda de 595 nm. interpolando los valores de absorbancia de los antígenos en la curva tipo (figura 34). La cantidad total de proteínas obtenida se muestra en el cuadro 1.

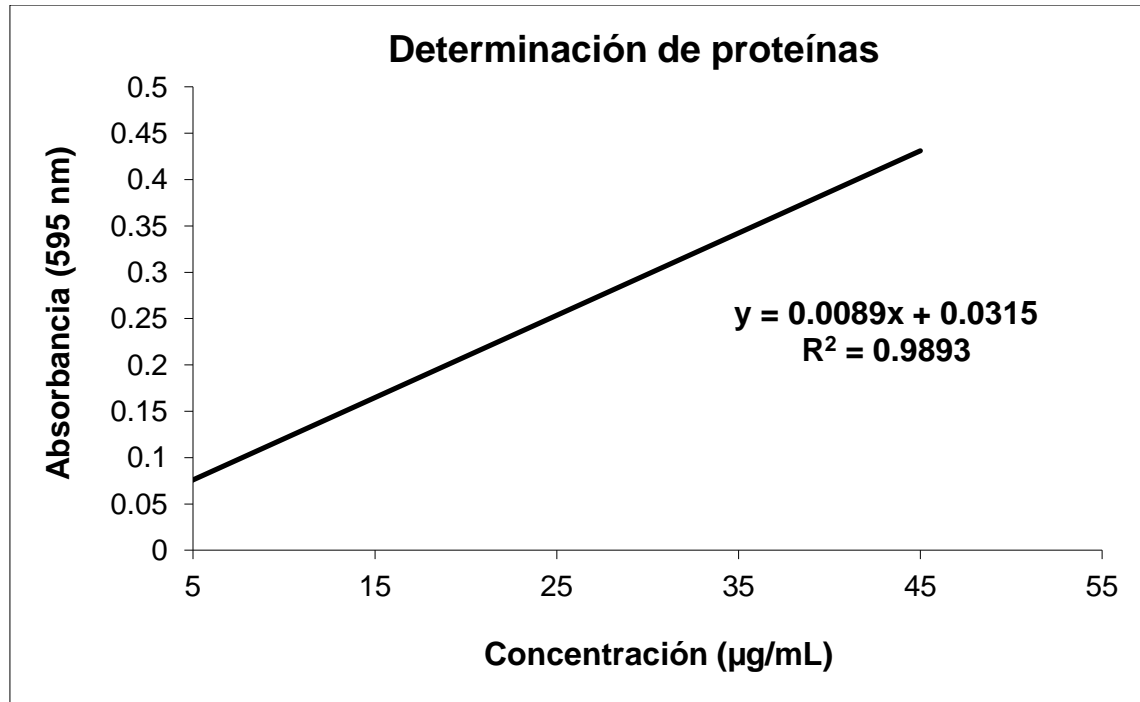


Figura 34. Curva patrón para la determinación de proteínas de los distintos antígenos presentados en el cuadro 1

Antígeno	Concentración de antígeno (µg/mL)
<i>Ascaris suum</i> (Extracto crudo)	4700
<i>Fasciola hepatica</i> (Extracto crudo)	2576
<i>Toxocara canis</i> (Excreción y secreción)	489
<i>Trichinella spiralis</i> (Excreción y secreción)	905
<i>Taenia crassiceps</i> (Fluido vesicular)	296

Cuadro 2. **Cuantificación de proteínas.** Resumen de la cuantificación de proteínas de los antígenos realizados durante todo el proyecto.

7.4 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTÍGENOS

Una vez conociendo la concentración de cada antígeno, se realizó un perfil electroforético en gel de poliacrilamida a una concentración del 12% (figura 35). Se usó como marcador de peso molecular un suero de humano sano. Se colocó en cada carril 50 µg/mL de proteína de cada uno de los antígenos se realizó el corrimiento y se tiñó con colorante de azul de Coomassie.

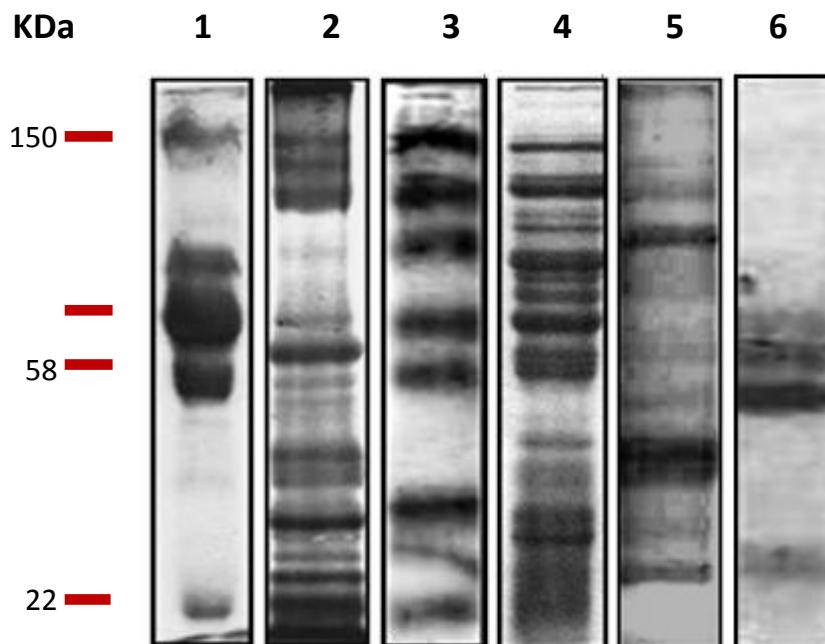


Figura. 35. **Patrón electroforético de los antígenos obtenidos.** Los antígenos se corrieron en gel de poliacrilamida al 12% y se revelaron con azul de Coomassie; de izquierda a derecha, se presentan, el marcador de peso molecular, el corrimiento del antígeno total de *Ascaris suum*, antígeno total de *Fasciola hepatica*, antígeno de recuperación de fluido vesicular de *Taenia crassiceps*, antígeno excreción y secreción de *Toxocara canis* y al último, el corrimiento del antígeno excreción y secreción de *Trichinella spiralis*.

7.5 TITULACIÓN DE CONJUGADO Y DE SUERO

La determinación de las diluciones del conjugado y de los sueros para la determinación de anticuerpos se calculó para cada antígeno obtenido en este proyecto; como testigo del ensayo se emplearon sueros de ratón sano (testigo negativo) y sueros de ratón infectados (*Trichinella* y *Taenia*) o inmunizados (*Toxocara*, *Fasciola*). Se realizaron diluciones dobles seriadas de cada suero a partir de una dilución 1:100 hasta 204,800. Así mismo, se utilizaron 3 diluciones de conjugado, 1:500, 1:1000 y 1:2000 (figuras 36, 37, 38, 39 y 40). En general se observó un decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero inmunizado con el antígeno, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observó que aunque entre la dilución 1:500 y 1:1000 la tendencia fue similar entre ellas, mientras que en una dilución de 1:2000 la reactividad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor diferencia entre suero positivo y suero negativo. Para tener un valor de referencia más confiable como negativo se obtuvo un suero de mapache domestico libre de parásitos y se comparo absorbancias (figura 41) con el suero negativo (ratón) para observar si existía diferencia significativa utilizando el ensayo antes mencionado. Observando la grafica correspondiente se aprecia una diferencia mínima entre ambos sueros.

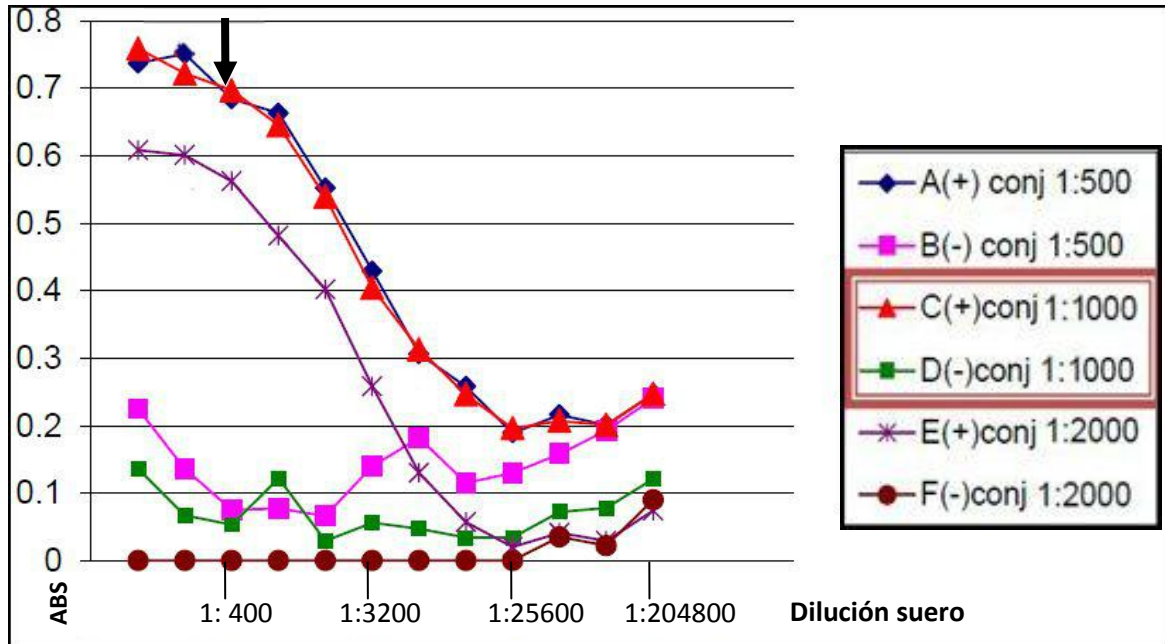


Figura 36. Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti-*Ascaris suum*. En esta gráfica se observa cómo va el decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero ratones inmunizados con ETA de *Ascaris suum*, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observa que entre la dilución 1:500 y 1:1000 no hay diferencia significativa y en una dilución de 1:2000 la sensibilidad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor distancia entre suero positivo y suero negativo.

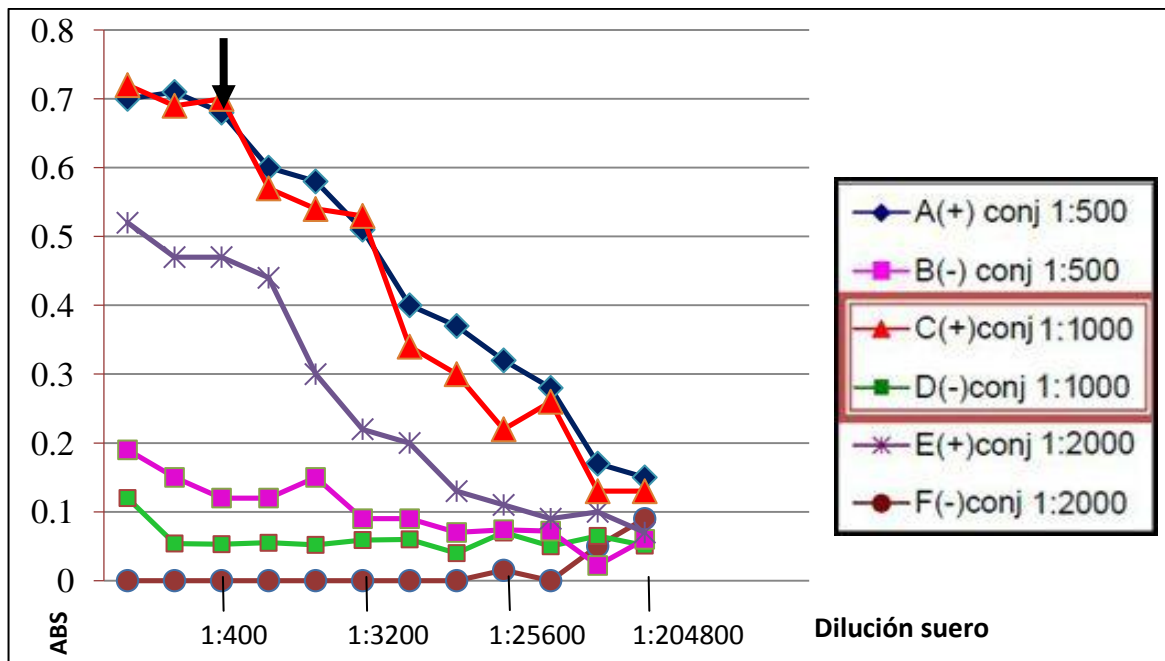


Figura 37. Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti-*Fasciola hepática*. En esta gráfica se observa cómo va el decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero ratones inmunizados con ETA de *Fasciola hepática*, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observa que entre la dilución 1:500 y 1:1000 no hay diferencia significativa y en una dilución de 1:2000 la sensibilidad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor distancia entre suero positivo y suero negativo.

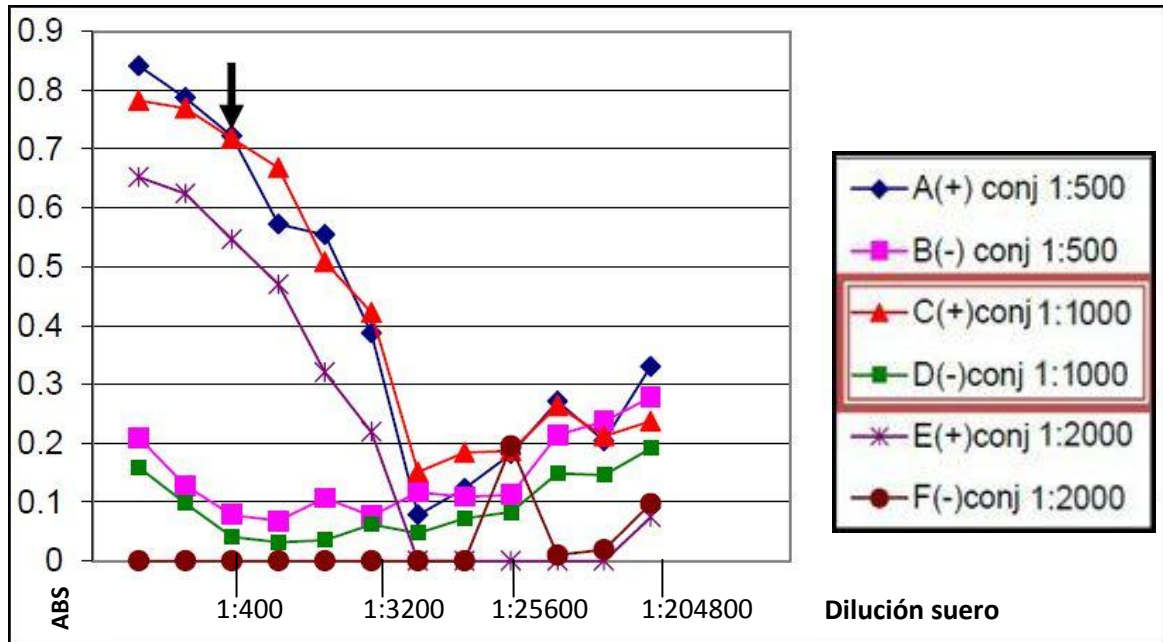


Figura 38. **Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti-*Taenia crassiceps***. En esta gráfica se observa cómo va el decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero ratones inmunizados con antígeno de fluido vesicular de *Taenia crassiceps*, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observa que entre la dilución 1:500 y 1:1000 no hay diferencia significativa y en una dilución de 1:2000 la sensibilidad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor distancia entre suero positivo y suero negativo.

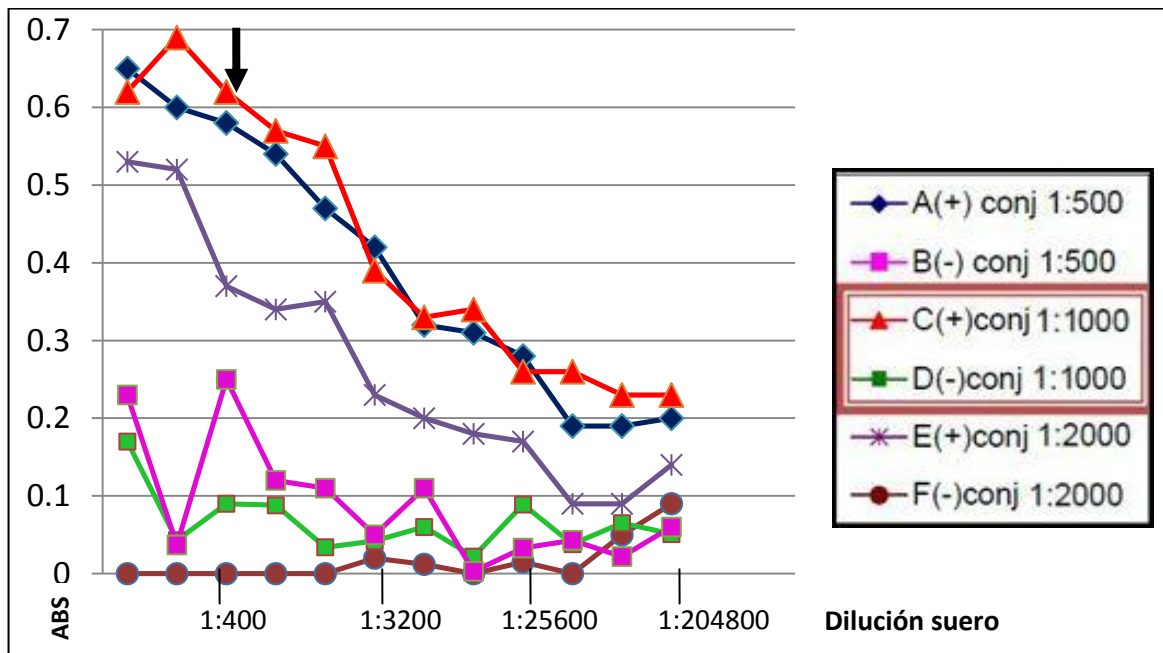


Figura 39. **Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti-*Toxocara canis***. En esta gráfica se observa cómo va el decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero ratones inmunizados con antígeno de excreción y secreción de *Toxocara canis*, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observa que entre la dilución 1:500 y 1:1000 no hay diferencia significativa y en una dilución de 1:2000 la sensibilidad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor distancia entre suero positivo y suero negativo.

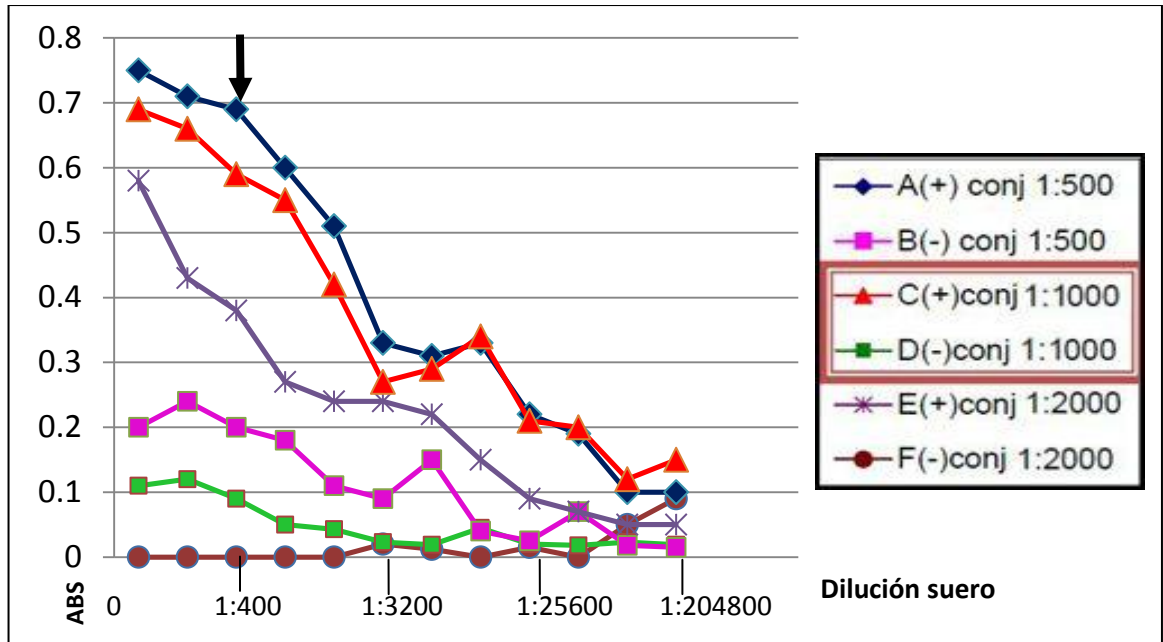


Figura 40. **Titulación de conjugado proteína A/peroxidasa y de suero anti-*Trichinella spiralis***. En esta gráfica se observa cómo va el decremento de los valores de absorbancia conforme aumenta la dilución de suero ratones inmunizados con antígeno de excreción y secreción de *Trichinella spiralis*, hasta llegar al mínimo valor detectable, así mismo se observa que entre la dilución 1:500 y 1:1000 no hay diferencia significativa y en una dilución de 1:2000 la sensibilidad disminuye, por lo que las diluciones convenientes son de 1:400 de suero (flecha) y de 1:1000 de conjugado (recuadro rojo), en donde hay mayor distancia entre suero positivo y suero negativo.

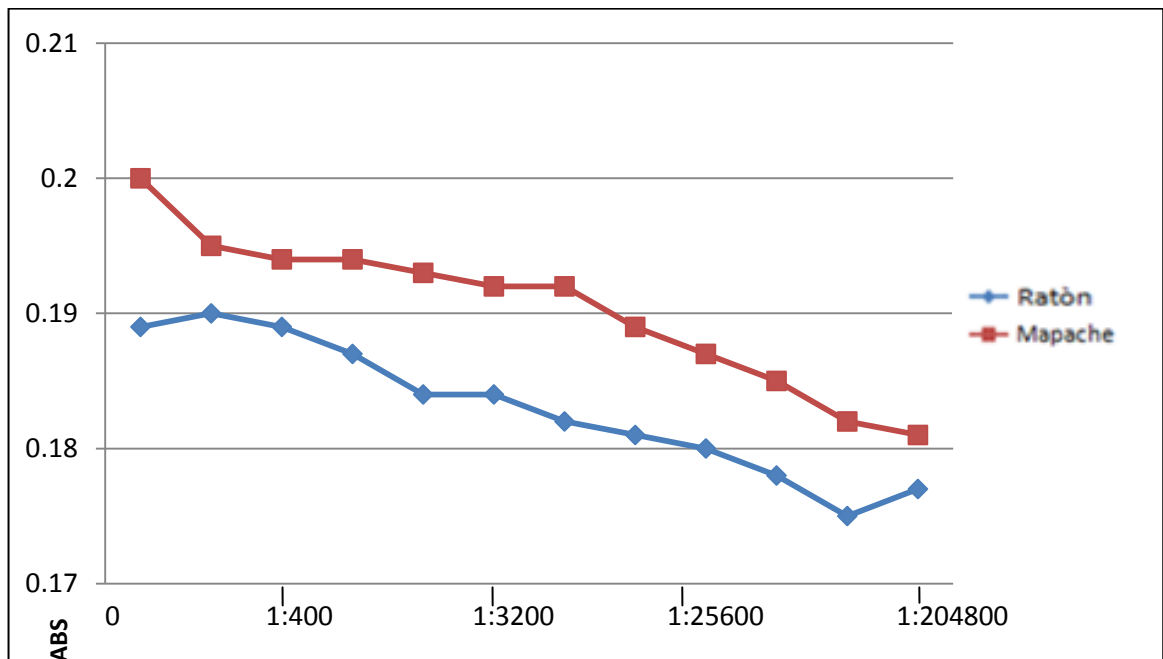


Figura 41. **Comparación de absorbancias entre suero de mapache y suero de ratón utilizando conjugado proteína A/peroxidasa a una dilución 1:1000**. En esta grafica se observa la comparación entre sueros ambos negativos para los antígenos trabajados en este proyecto con la dilución de conjugado óptima en las titulaciones. Se puede observar que hay una diferencia muy mínima entre ambos sueros lo cual constata que se puede utilizar cualquiera de los dos sueros como testigo negativo en las ELISAS realizadas en este proyecto puesto que reaccionan de manera similar y esto no afectara el diagnostico de las muestras.



7.6 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR ELISA

Para realizar el ELISA, se llevó a cabo el procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos.

Para obtener este valor, de cada antígeno se utilizaron los valores de absorbancia menores o iguales a la absorbancia del testigo negativo.

El valor de corte para cada antígeno se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$VC = X + 3\delta$$

Donde:

X = Promedio de las absorbancias de los sueros negativos.

δ = Desviación estándar.

VC = Valor de corte.

Las absorbancias, mayores al punto de corte (línea roja) se consideraron positivos

7.6.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Ascaris suum*

Las figuras 42 y 43 muestran la determinación de anticuerpos contra *A. suum*. En lo que se refiere a coatíes, se encontró una frecuencia de positividad del 22.12% del total de 171 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011; sin embargo por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue de 31.57% y 25.8% en 2009, 25.71% y 12% en 2010, 24.13% y 14.29% en 2011.

Refiriéndose a mapaches, se encontró una frecuencia de positividad del 18.13% del total de 60 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011; sin embargo por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue de 22.22% y 22.27% en 2009, 14.28% y 37.5% en 2010, 18.18% y 0% en 2011.

Lo cual indica que durante todo el periodo de muestreo ambos prociñidos estuvieron en contacto con ascaridos, presentándose la reacción contra este antígeno y los anticuerpos contenidos en el suero de los animales en un 20% de positividad del total de muestras obtenidas.

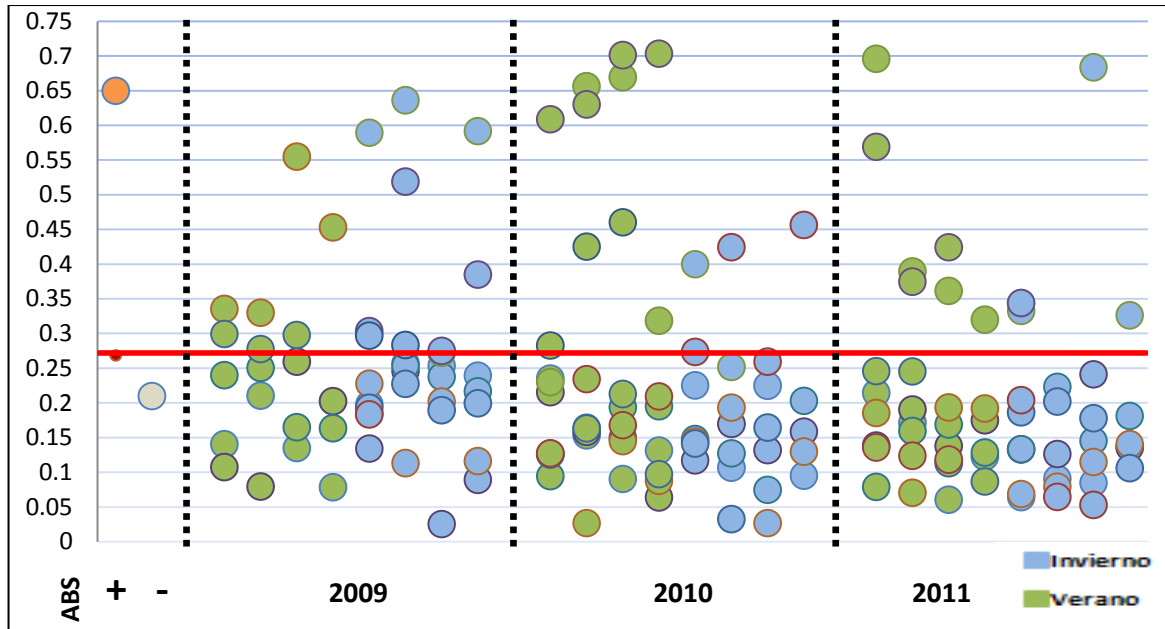


Figura 42. Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de *Ascaris suum* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En año 2009, de 19 muestras obtenidas en verano hubo 6 positivas, a su vez en invierno de 31 muestras recolectadas hubo 8 positivas. En 2010, de 35 muestras adquiridas en verano hubo 9 positivas, en época de invierno de 25 muestras logradas hubo 3 positivas. En 2011, de 29 muestras logradas en verano hubo 7 positivas, por último en invierno de 28 muestras recolectadas hubo 4 positivas.

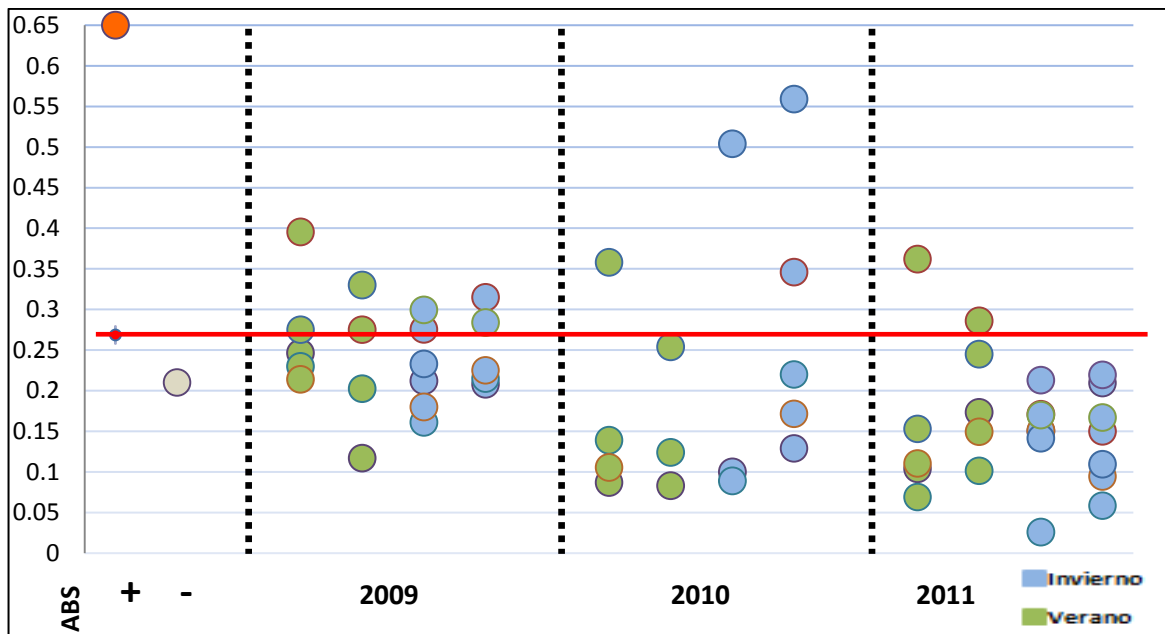


Figura 43. Reactividad de los sueros de mapachees contra el antígeno de *Ascaris suum* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En año 2009, de 9 muestras obtenidas en verano hubo 2 positivas, a su vez en invierno de 11 muestras recolectadas hubo 3 positivas. En 2010, de 7 muestras adquiridas en verano hubo 1 positiva, en época de invierno de 8 muestras logradas hubo 3 positivos. En 2011, de 11 muestras logradas en verano hubo 2 positivas, por último en invierno de 14 muestras ninguna fue positiva.

7.6.2 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Fasciola hepatica*

Las figuras 44 y 45 muestran la determinación de anticuerpos contra *F. hepatica*. En lo que se refiere a coatíes y mapaches, se encontró una frecuencia de positividad nula del total de 171 y 60 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011.

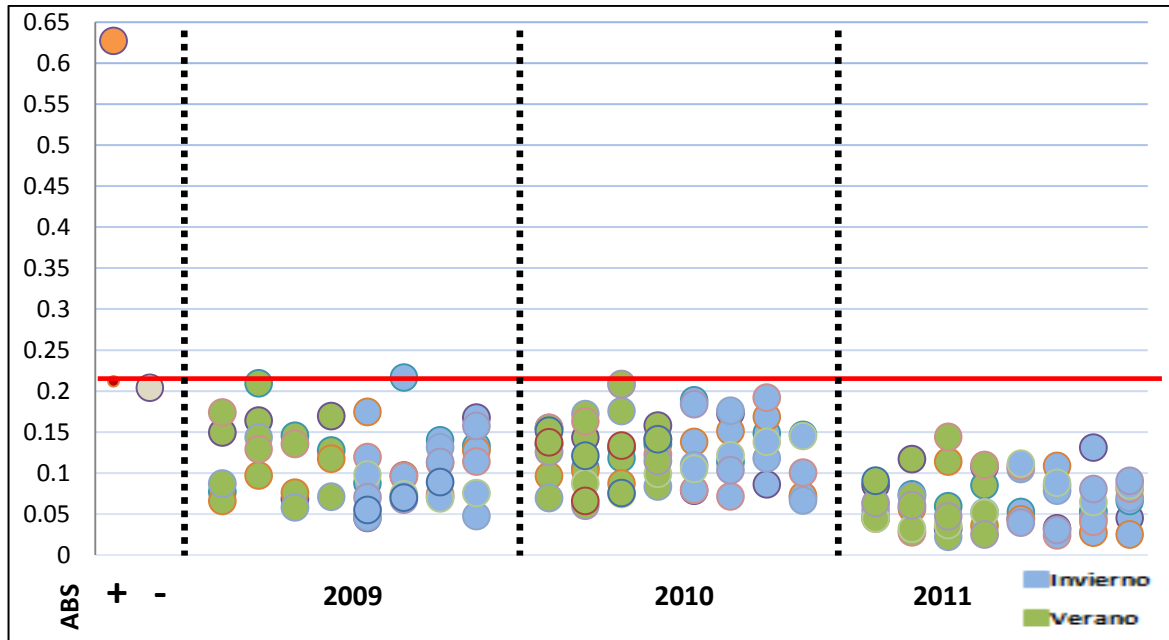


Figura 44. Reactividad de sueros de coatíes contra el antígeno de *Fasciola hepatica* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 171 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

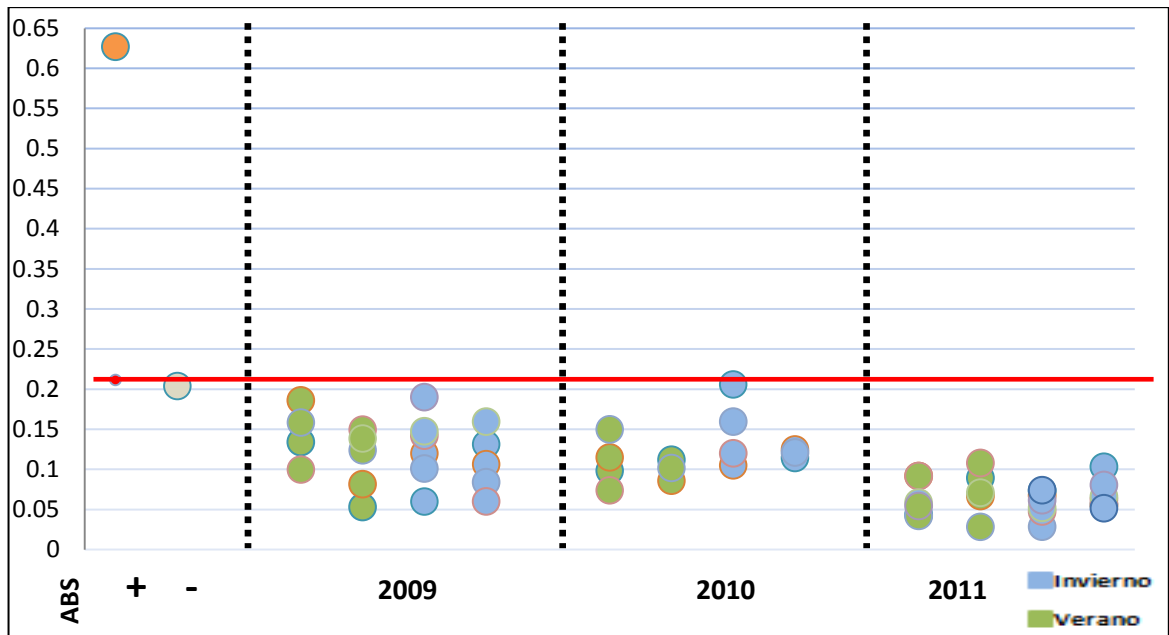


Figura 45. Reactividad de sueros de mapaches contra el antígeno de *Fasciola hepatica* por ELISA. La imagen muestra la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 60 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

7.6.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Taenia crassiceps*

Las figuras 46 y 47 muestran la determinación de anticuerpos contra *T. crassiceps*. En lo que se refiere a coatíes y mapaches, se encontró una frecuencia de positividad nula del total de 171 y 60 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011.

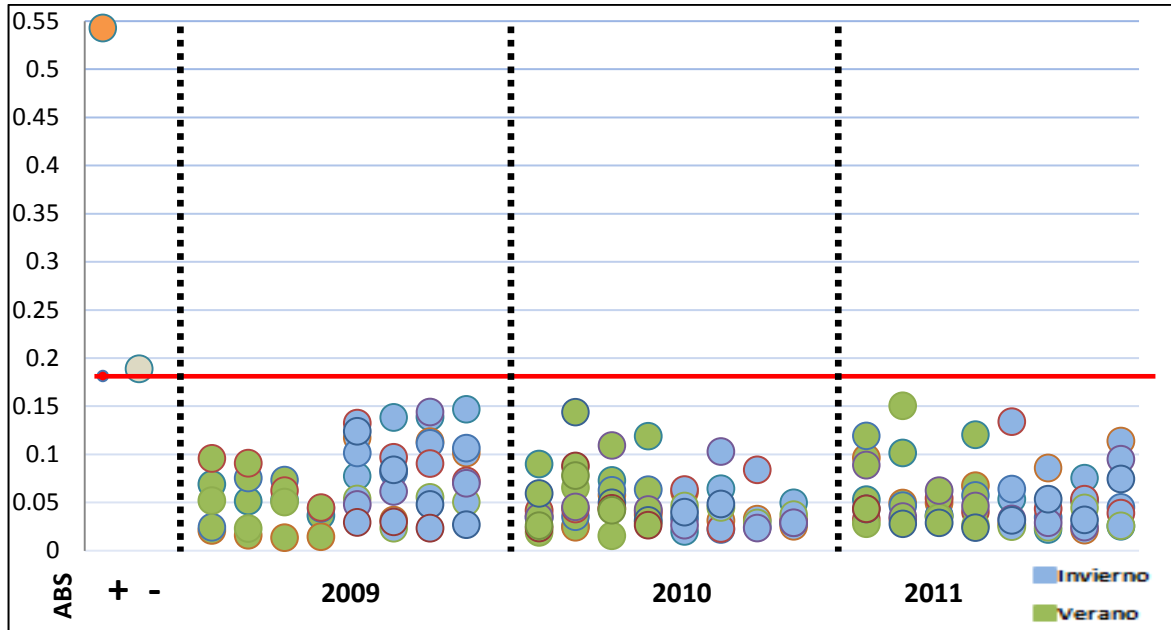


Figura 46. Reactividad de sueros de coatíes contra el antígeno de *Taenia crassiceps* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 171 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

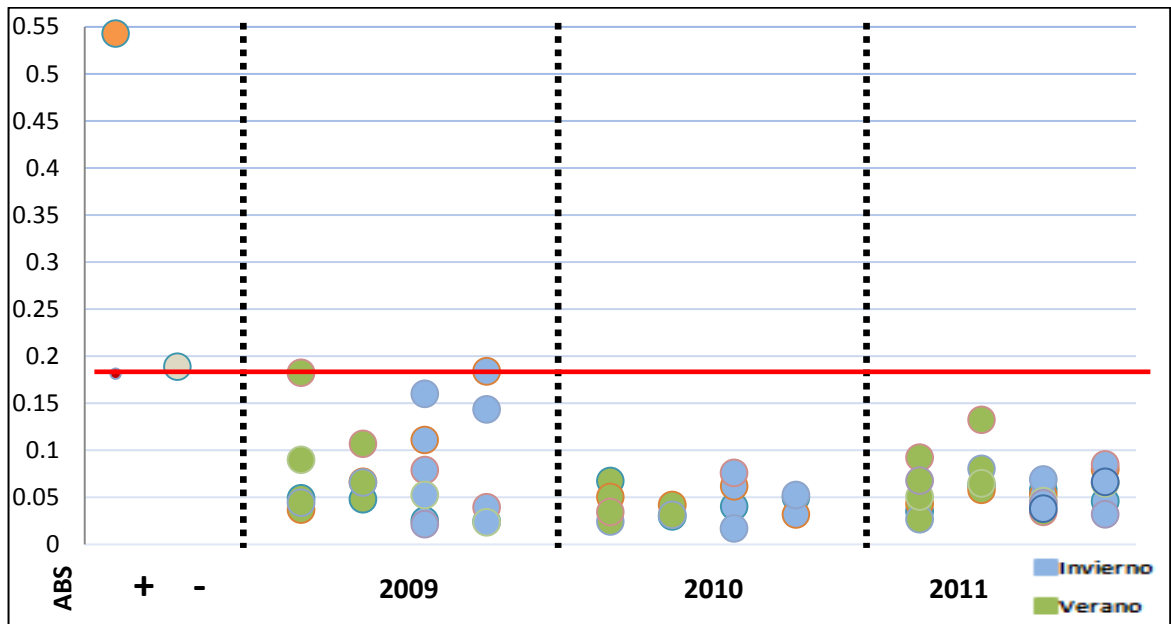


Figura 47. Reactividad de sueros de mapaches contra el antígeno de *Taenia crassiceps* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 60 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

7.6.4 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Toxocara canis*

Las figuras 48 y 49 muestran la determinación de anticuerpos contra *T. canis*. En lo que se refiere a coatíes y mapaches, se encontró una frecuencia de positividad nula del total de 171 y 60 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011.

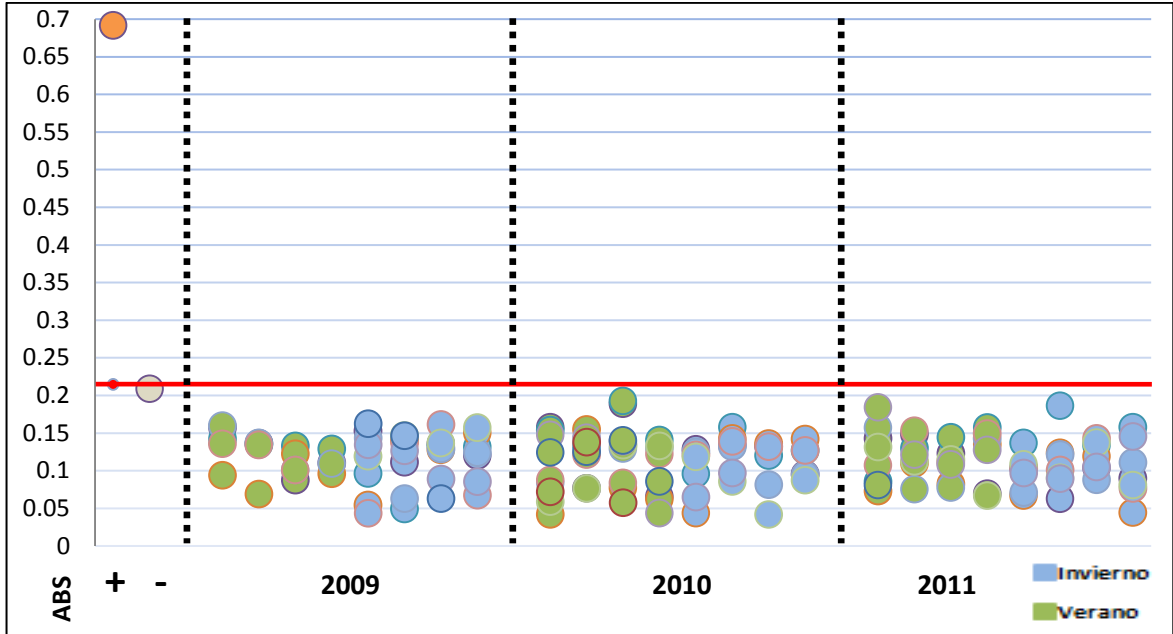


Figura 48. Reactividad de sueros de coatíes contra el antígeno de *Toxocara canis* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 171 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

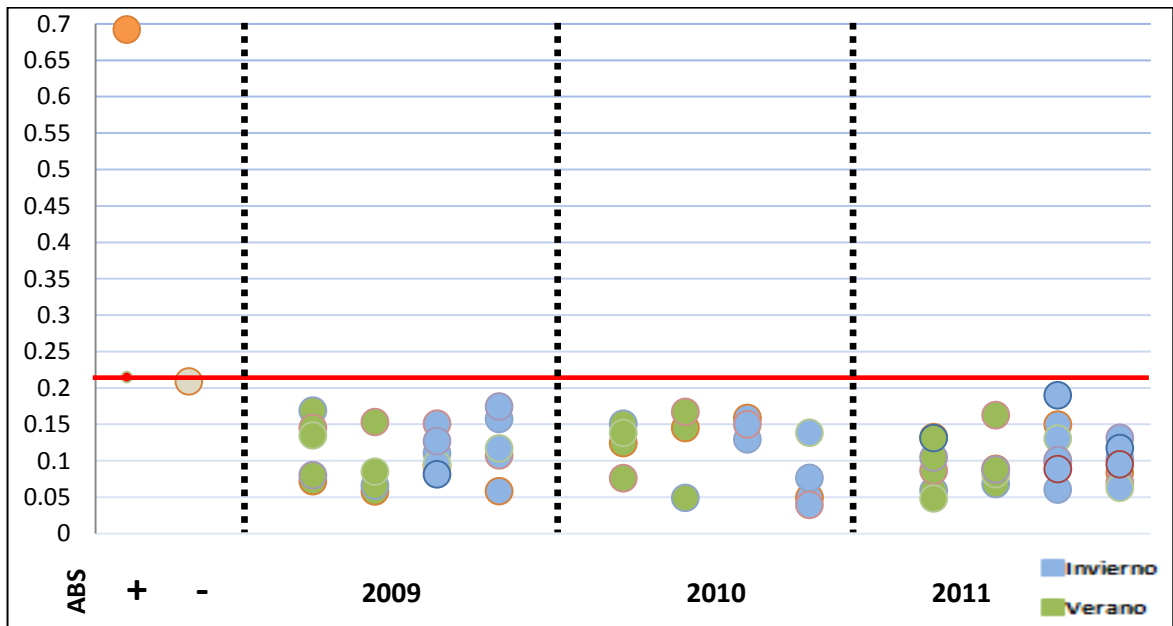


Figura 49. Reactividad de sueros de mapaches contra el antígeno de *Toxocara canis* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. En que del total de 60 muestras obtenidas durante todo el periodo ninguna es positiva.

7.6.5 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Trichinella spiralis*

Las figuras 50 y 51 muestran la determinación de anticuerpos contra *T. spiralis*. En lo que se refiere a coatíes, se encontró una frecuencia de positividad del 3.5% del total de 171 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011; sin embargo por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue nula tanto en 2009 y 2010. Esto cambio en 2011 donde se encontró positividad de 6.89% y 14.28%.

Refiriéndose a mapaches, se encontró una frecuencia de positividad del 3.3% del total de 60 muestras tomadas en el periodo comprendido de 2009 a 2011; sin embargo por año y muestreo (verano e invierno), la frecuencia de positividad fue nula tanto en 2009 y 2010. Esto cambio en 2011 donde se encontró positividad de 9.09% y 7.14%.

Lo cual indica que durante el periodo comprendido hasta 2010 no hubo reactividad contra este helminto en ambos prociénidos pese a ello en los últimos dos muestreos surgió un posible brote de contacto asociado a este trichinelido presentándose la reacción contra este antígeno y los anticuerpos contenidos en el suero de ambos animales en un 3% de positividad del total de muestras obtenidas.

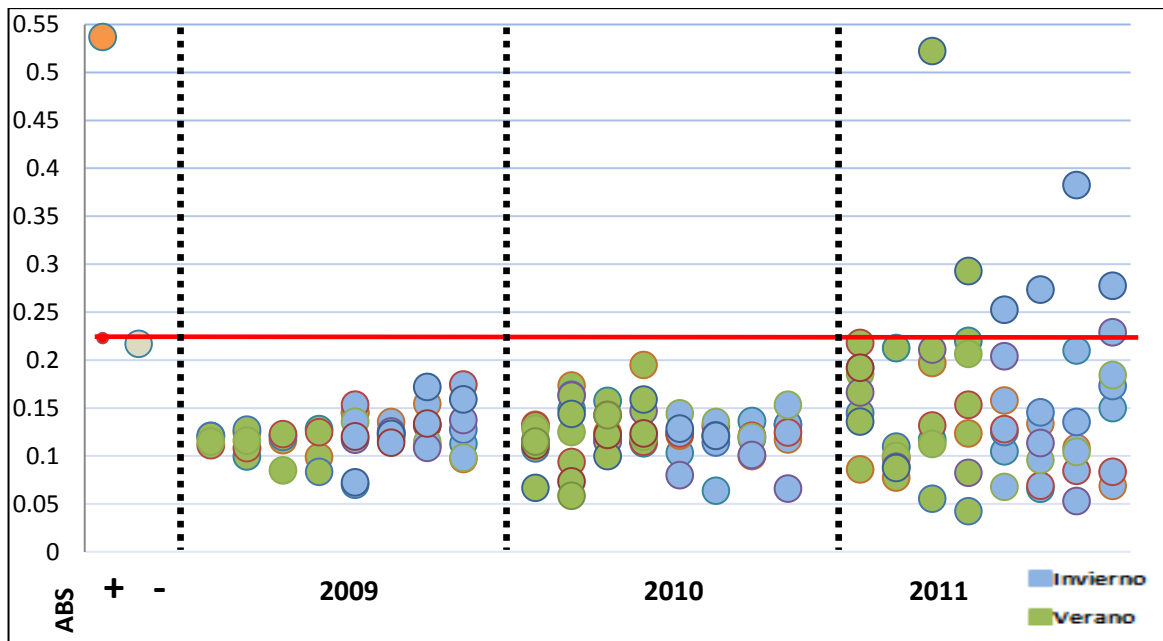


Figura 50. Reactividad de los sueros de coatíes contra el antígeno de *Trichinella spiralis* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo y muestras procesadas. Se aprecia que tanto en año 2009 como 2010 que ninguna muestra procesada en este periodo fue positiva. Sin embargo en año 2011, de 29 muestras obtenidas en verano hubo 2 positivas y en invierno de 28 muestras hubo 4 positivas.

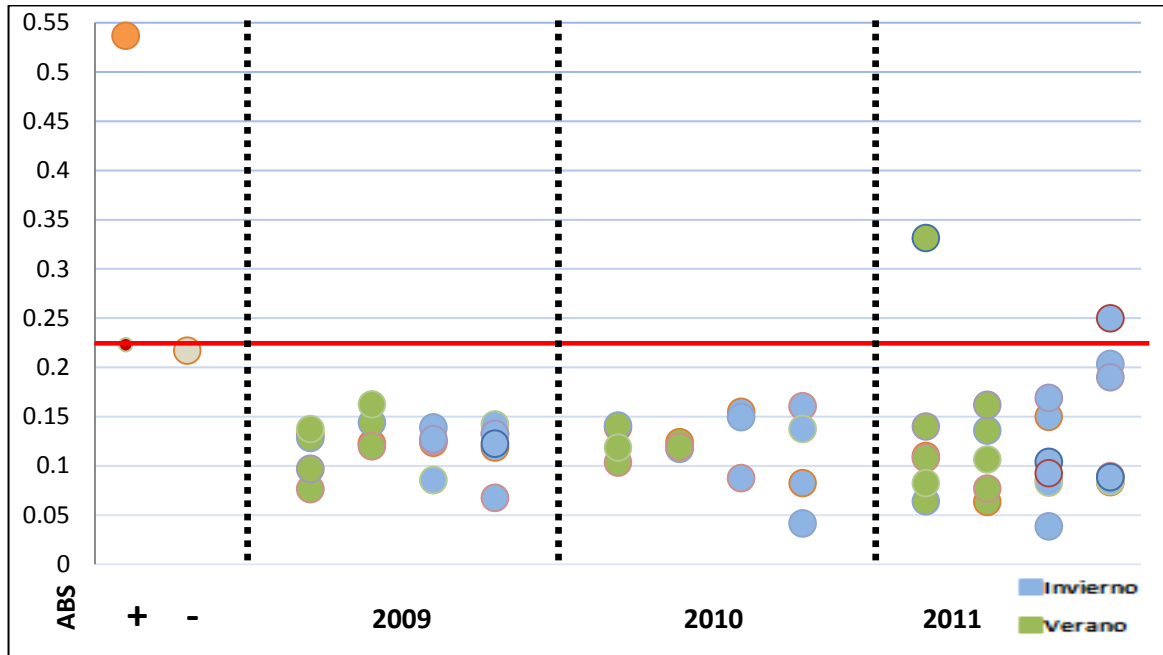


Figura 51. Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de *Trichinella spiralis* por ELISA. Se exhibe la reactividad presente de las muestras del periodo 2009 a 2010 leídas a 490nm, de izquierda a derecha se muestra el testigo positivo, testigo negativo, siguiendo las muestras procesadas. Se aprecia que tanto en año 2009 como 2010 que ninguna muestra procesada en este periodo fue positiva. Sin embargo en año 2011, de 11 muestras obtenidas en verano hubo 2 positivas y en invierno de 14 muestras hubo 4 positivas.

7.7 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE IET

Par las muestras con resultado positivo para *Ascaris suum* (figuras 52, 53, 54 y 55) y *Trichinella spiralis* (figura 56) se determino la reactividad de los sueros por técnica de inmunoelectrotransferencia. Realizado conforme a la metodología indicada anteriormente.

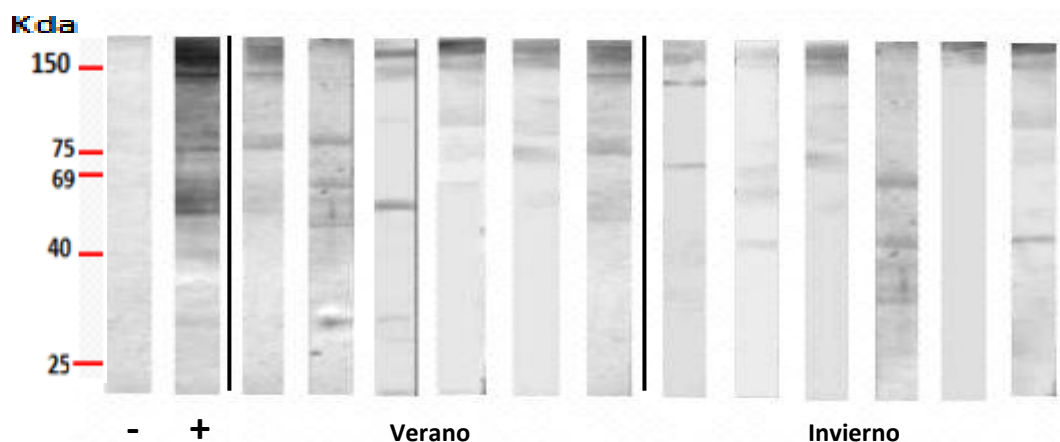


Figura 52. Reactividad de sueros de coatíes contra el antígeno de *Ascaris suum* (muestreos año 2009) por inmunoelectrotransferencia. De izquierda a derecha se muestran testigo negativo y positivo, posteriormente muestras de verano e invierno todas ellas positivas en ELISA, se puede observar que comparten bandas de 150Kda, 75Kda y algunas bandas de 40Kda con el testigo positivo.

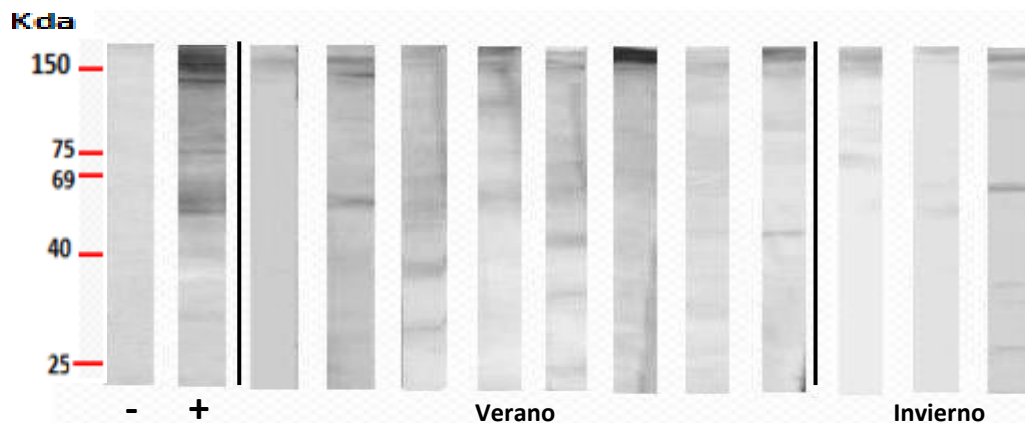


Figura 53. Reactividad de sueros de coatíes contra el antígeno de *Ascaris suum* (muestréos año 2010) por inmunoelectrotransferencia. De izquierda a derecha se muestran testigo negativo y positivo, posteriormente muestras de verano e invierno, todas ellas positivas en ELISA, se puede observar que comparten bandas de 150Kda y 75Kda con el testigo positivo.

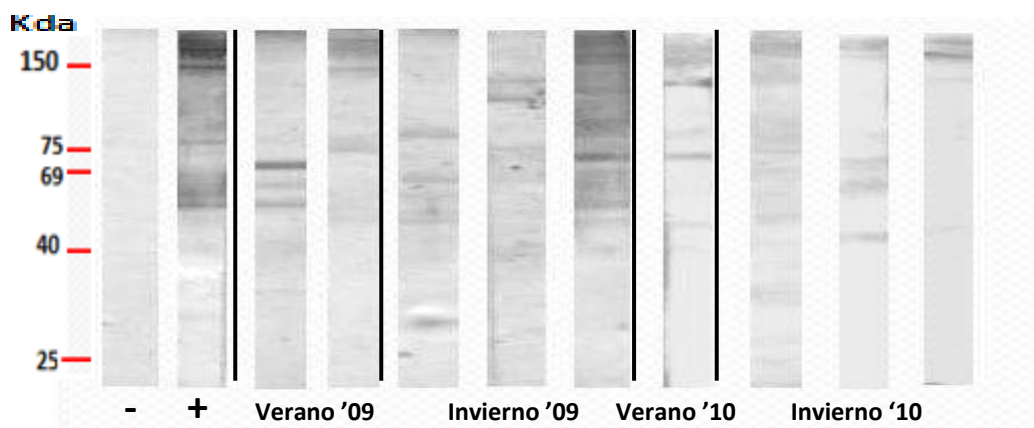


Figura 54. Reactividad de los sueros de mapaches contra el antígeno de *Ascaris suum* (muestréos 2009-2010) por inmunoelectrotransferencia. De izquierda a derecha se muestran testigo negativo y positivo, posteriormente muestras de verano e invierno 2009, siguiendo verano e invierno 2010, todas ellas positivas en ELISA, se puede observar que comparten banda de 150Kda y 75Kda con el testigo positivo.

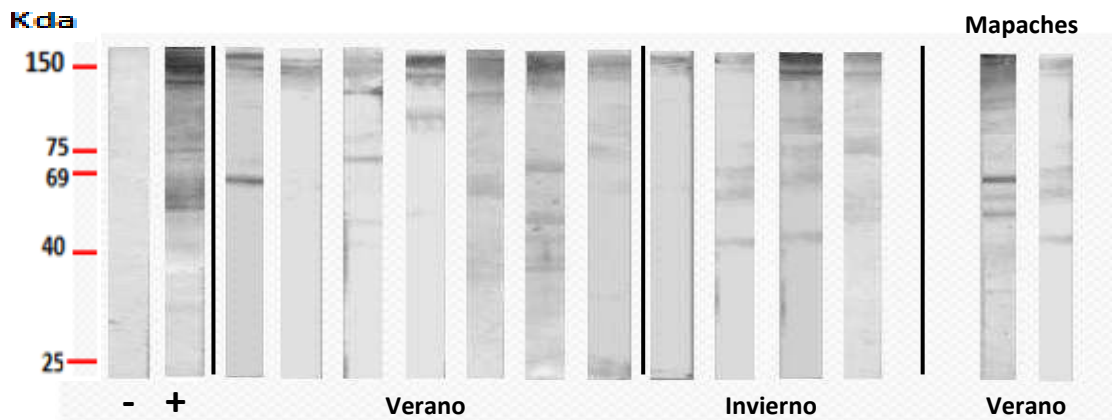


Figura 55. Reactividad de los sueros de mapaches y coatíes contra el antígeno de *Ascaris suum* (muestréos año 2011) por inmunoelectrotransferencia. De izquierda a derecha se muestran testigo negativo y positivo, posteriormente muestras de verano e invierno de coatíes, prosiguiendo muestras de verano de mapaches, todas ellas positivas en ELISA, se puede observar que comparten banda de 150Kda algunas de 69Kda y 75Kda con el testigo positivo.

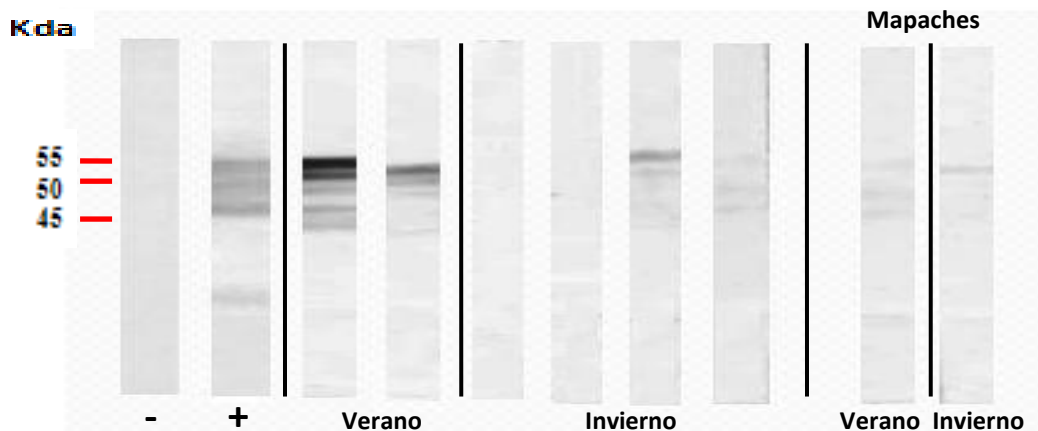


Figura 56. Reactividad de los sueros de coatíes y mapaches contra el antígeno de *Trichinella spiralis* (muestreos año 2011) por inmunoelectrotransferencia. De izquierda a derecha se muestran testigo negativo y positivo, posteriormente muestras de verano e invierno de coatíes, prosiguiendo muestras de verano e invierno de mapaches, todas ellas positivas en ELISA, se puede observar que comparten bandas de 55,50 y 45Kda con el testigo positivo.

7.8 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE AGLUTINACIÓN (REACCIONES FEBRILES)

La determinación de anticuerpos contra bacterias por aglutinación se realizó haciendo la determinación de 8 a 10 muestras por muestreo tanto de coatíes como de mapaches para que tuviesen el mismo número de muestras en ambos sujetos de estudio. La interpretación fue siguiendo el inserto del equipo comercial, tomando en cuenta para este método el testigo positivo (título de 1:160-1:320 en los distintos antígenos); lo cual se corroboró con el inserto del “kit” de antígenos febriles de BioRad® que menciona que el título mínimo es de 1:80. Además el testigo negativo no mostro aglutinación con ninguno de los antígenos enfrentados. El criterio utilizado para considerar un suero como normal fue que estos sueros fueran reactivos entre los títulos de 1:20,1:40 y hasta 1:80 (figuras 57, 58, 59, 60, 61 y 62).

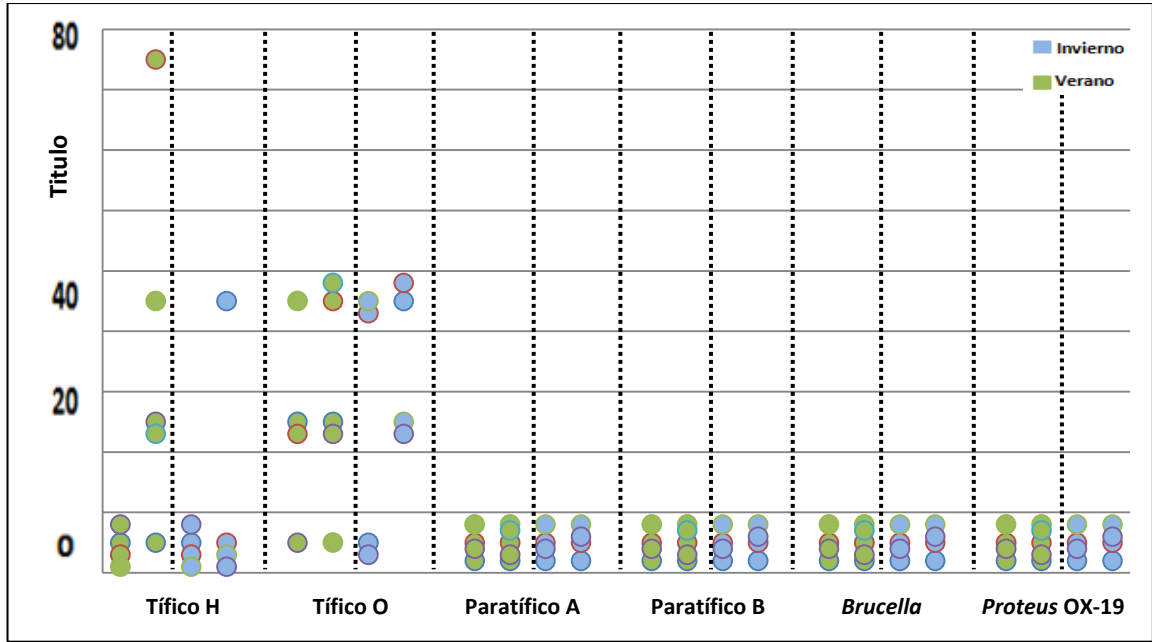


Figura 57. Reactividad de los sueros de coatíes del periodo 2009 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad de los sueros contra antígenos febriles, de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 9 y 8 muestras analizadas en las dos épocas.

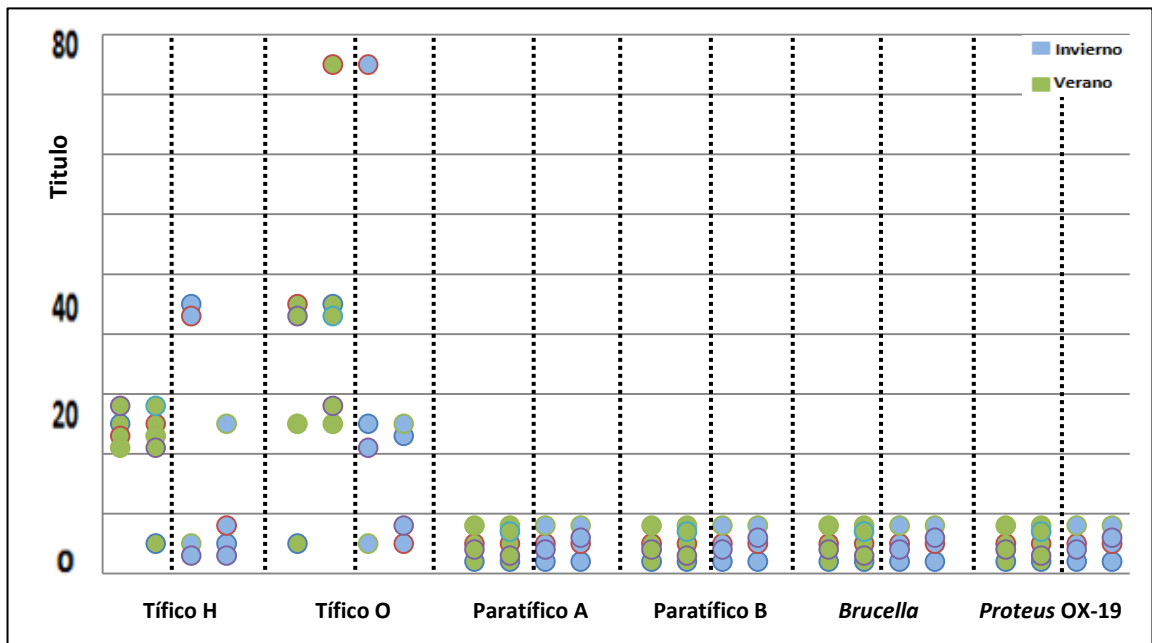


Figura 58. Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2009 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad contra antígenos febriles, de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 9 y 8 muestras analizadas en las dos épocas.

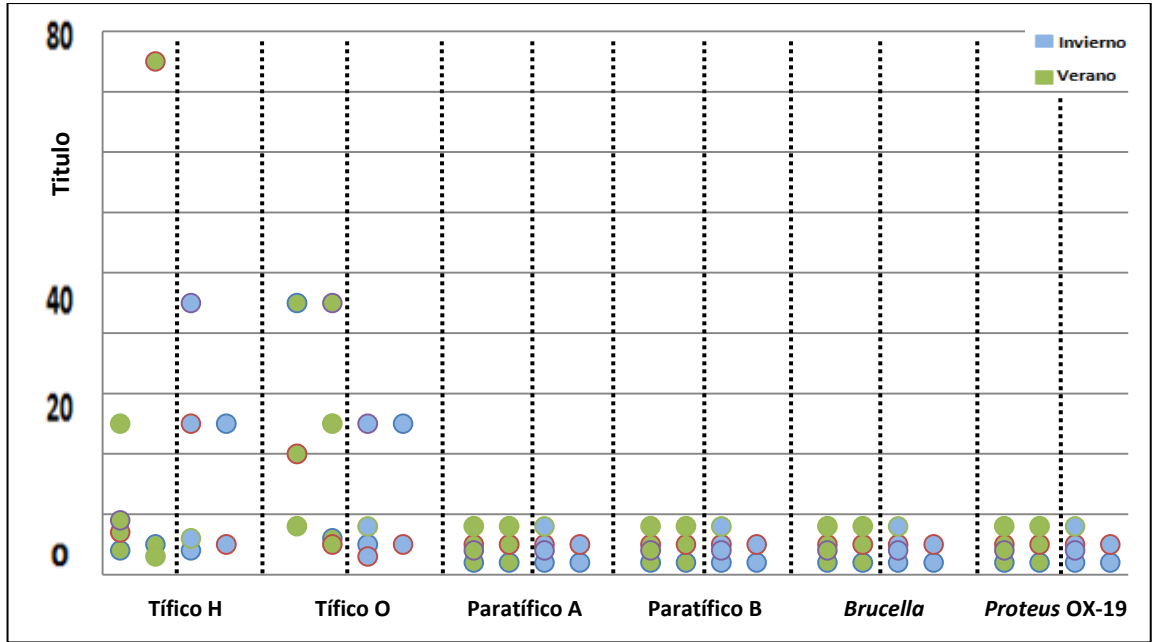


Figura 59. Reactividad de los sueros de coatis del periodo 2010 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad contra antígenos febriles, donde de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 7 y 6 muestras analizadas en las dos épocas.

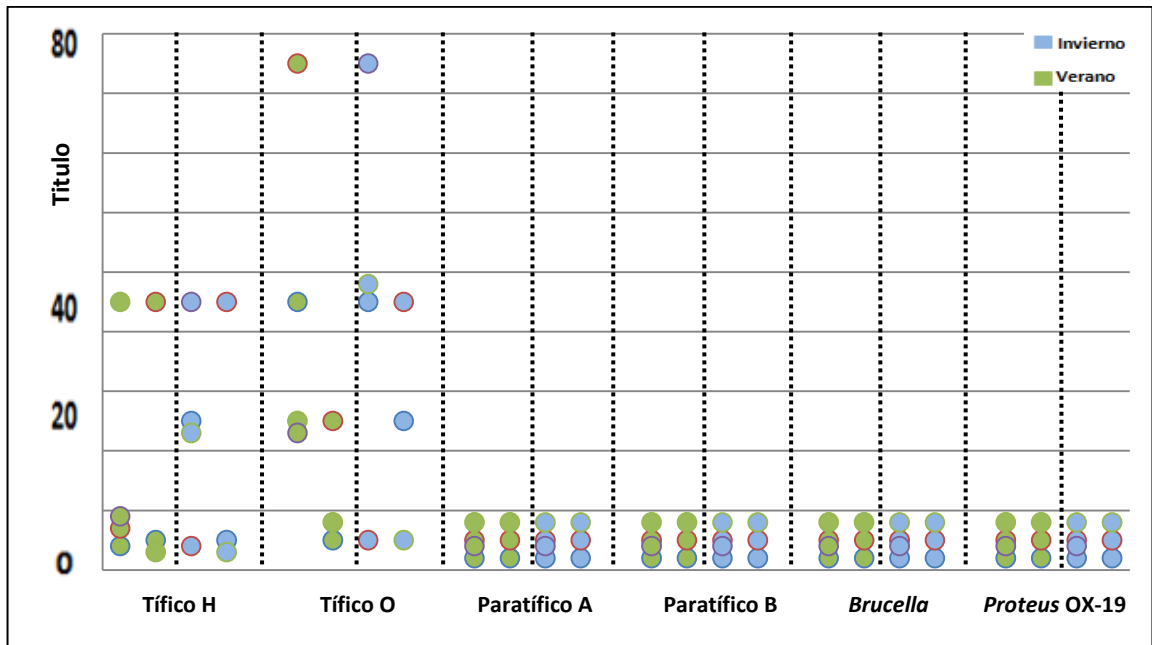


Figura 60. Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2010 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad contra antígenos febriles, donde de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 7 y 6 muestras analizadas en las dos épocas.

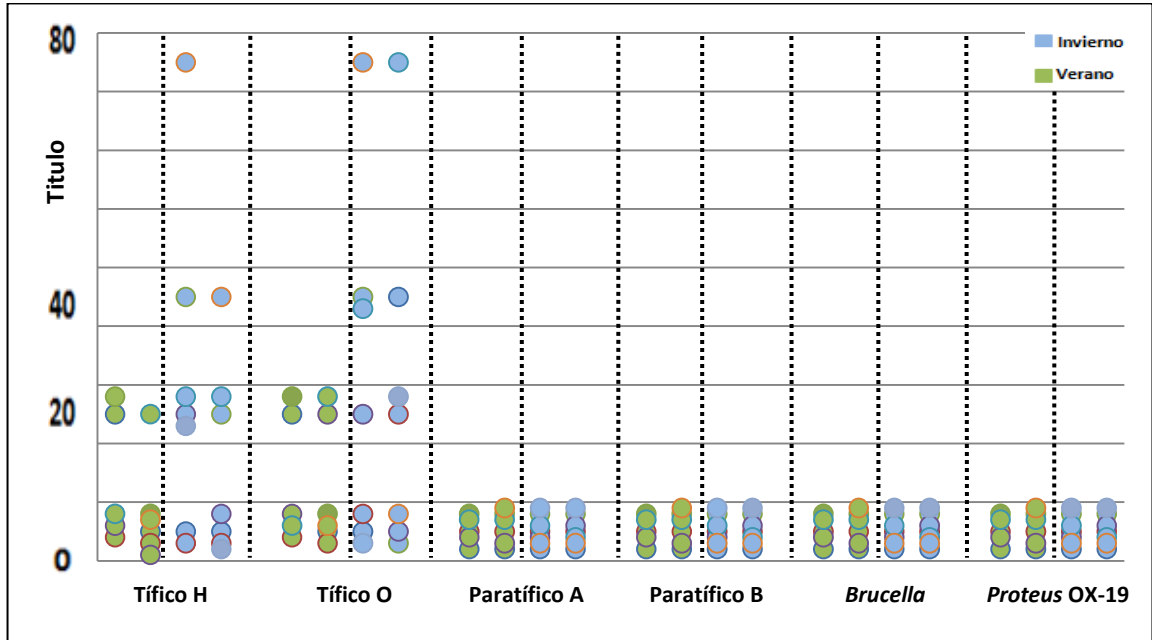


Figura 61. Reactividad de los sueros de coatíes del periodo 2011 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad contra antígenos febriles, donde de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 11 y 14 muestras analizadas en las dos épocas.

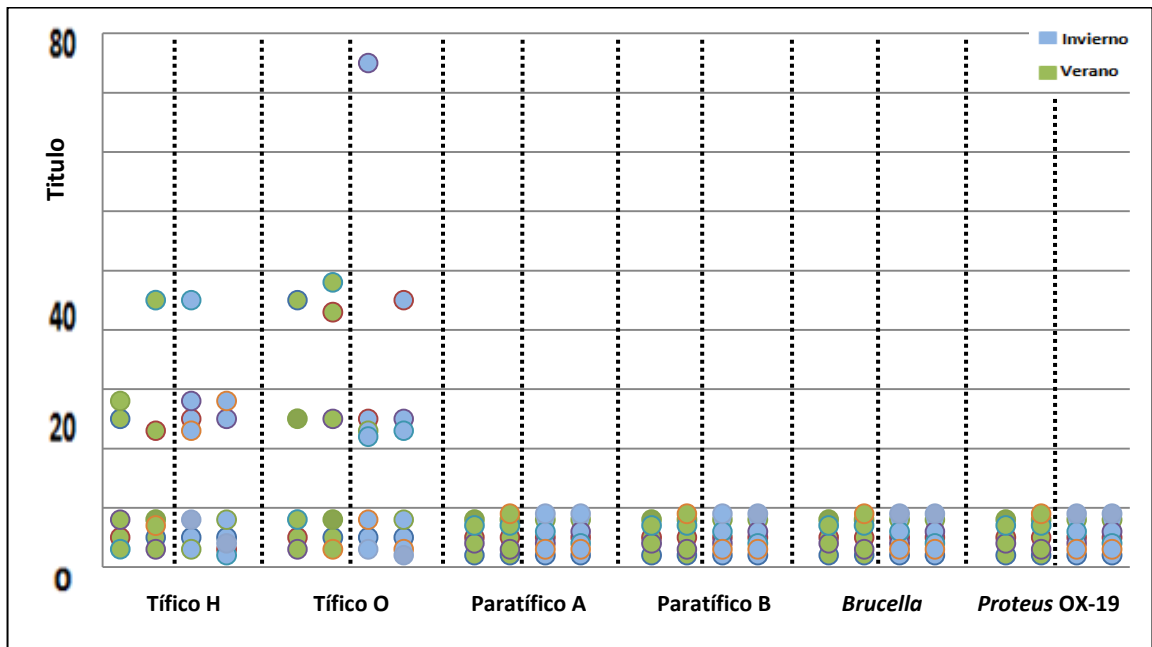


Figura 62. Reactividad de los sueros de mapaches del periodo 2011 contra antígenos bacterianos causantes de cuadros febriles por aglutinación. Se exhibe la reactividad contra antígenos febriles, donde de izquierda a derecha se muestran los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella typhi*, siguiendo los dos antígenos que indican presencia de *Salmonella paratyphi*, continuando el antígeno para reconocer *Brucella* y por último el antígeno que mediante reacción cruzada busca tanto a *Proteus* como a *Rickettsia*. Se puede observar que hay títulos solo para los antígenos que detectan presencia de *Salmonella typhi* en un rango desde 20 hasta 80 en las 11 y 14 muestras analizadas en las dos épocas.



8. DISCUSIÓN

8.1 OBTENCIÓN DE SUEROS DE COATÍES Y MAPACHES

Conforme a los muestreos realizados durante el periodo comprendido de 2009-2011, se observa que hay diferencia entre el número de muestras entre coatíes y mapaches, esto debido al método de captura utilizado en ellos, tomando en cuenta para la elección del método de captura los hábitos de las especies, sabiendo que los coatíes son de costumbres diurnas se recurrió al método de dardeo, los mapaches que por naturaleza son nocturnos se trapearon. Teniendo en mente lo anterior se puede decir que tiene mucho que ver el método utilizado en ellos, en donde el método de dardeo es mas específico ya que se captura el espécimen deseado y el método de trapeo es inespecífico ya que no siempre se captura el animal querido (Evans, 2002), pese a eso se logró obtener una cantidad representativa de sueros de ambas especies, en cuyo caso no se eligió el sexo ni la edad ya que en realidad fueron muestreos azarosos puesto que no se tiene la estimación de cuantos animales constituyen la población local.

Las capturas de prociénidos están reportadas en los trabajos de Evans, (2002) y Fowler, (1978) por citar algunos. Por lo que el manejo y captura de los mismos ya fue realizado con anterioridad.

8.2 OBTENCIÓN DE HELMINTOS

Los helmintos utilizados en este proyecto como modelo para determinación de anticuerpos se obtuvieron de distintos recursos. Los parásitos de *Ascaris suum* y *Toxocara canis*, se obtuvieron de intestinos de cerdos y perros respectivamente, infectados naturalmente, los gusanos de *Ascaris suum* fueron obtenidos de un rastro de Toluca ya que es difícil encontrar cerdos parasitados de forma natural en rastros cuyo control sanitario sea controlado, por lo que solo en cerdos de traspatio es posible encontrar infecciones naturales con *Ascaris suum*. En México y en otras partes del mundo esta forma de obtención de gusanos adultos es el único modelo viable (Frontera y cols., 2001, Yoshihara y cols., 2008, Yoshihara y cols., 1993, Kennedy y cols., 1989, Martínez-Barbosa, 2000).

La obtención de gusanos de *Toxocara canis* se realizó visitando un centro de control canino donde era más factible encontrar el helminto ya que los perros reclusos en estos centros a menudo son hospedadores de este parásito.

Para obtener *Fasciola hepatica* se visito distintos rastros pero solo se pudo conseguir un hígado del cual se obtuvieron los parásitos, donado por el rastro municipal de Pachuca, Hidalgo en todo el tiempo que duró el proyecto, esto debido a la aplicación de la NOM-194-SSA1-2004, en donde se especifica que cualquier víscera roja de un animal infectado debe ser decomisada.



Las larvas musculares de *Trichinella spiralis* se obtuvieron del musculo esquelético de las ratas wistar, mediante la digestión enzimática de la rata, donde se liberan las larvas encapsuladas del musculo por la acción del HCl y pepsina que con ayuda de movimiento mecánico y temperatura como lo describe el trabajo de Peña, 2001, propician las condiciones optimas para degradar el musculo y liberar las larvas (Peña, 2001; Steffan, 1987).

Los metacestodos de *Taenia crassiceps* fueron obtenidos de la parte peritoneal del ratón, debido a que se concentran en su tejido conectivo subcutáneo, las cavidades pleural y peritoneal de estos por lo que su obtención es sumamente sencilla y su reproducción asexual (estrobilación) por gemación (Fischer, 1994) hace que se obtengan una gran cantidad de ellos.

Debido a la problemática de obtención de algunos helmintos es necesaria la implementación de un modelo experimental que satisfaga la adquisición de estos helmintos.

8.3 PREPARACIÓN DE ANTÍGENOS Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

La producción de las diversas soluciones antigénicas se baso en la obtención de los parásitos adecuados (gusanos adultos, larvas musculares y metacestodos) de las fuentes indicadas anteriormente, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos para obtener soluciones antigénicas de empleo rutinario en el diagnóstico humano a partir de métodos mecánicos basados en la ruptura de tejidos, células, etc. (extracto crudo y recuperación de fluido vesicular) ó productos de excreción y secreción a partir de cultivo de parásitos, para su posterior uso en las técnicas diagnósticas. (De la rosa et al., 2000; González, 2009; Gutiérrez, 2008; Méndez, 2010).

Originalmente se tenía pensado realizar el antígeno de los productos de excreción-secreción para los helmintos trabajados a excepción de *Taenia*, ya que este antígeno libera gran cantidad de glicoproteínas que presentan componentes antigénicos (Meghji y Maizels, 1986; De Savygny, 1979; Espino, 1987) que son más específicos en los inmunoensayos, pero debido a problemas para obtener algunos helmintos vivos, como los gusanos de *Ascaris suum* que ya se encontraban muertos cuando llegaron al laboratorio, además también los gusanos encontrados de *Fasciola hepatica*, ya estaban muertos por el tiempo que tenía el hígado de ser extraído del animal, así como el número de gusanos obtenidos era poco para poder obtener el antígeno (Marcel *et al.*, 2002); para solucionar esto se podría emplear un modo experimental en el laboratorio como se dijo anteriormente, que satisfaga la necesidad de estos antígenos en futuros proyectos. Por lo que como alternativa se optó por el extracto total antigénico de ambos helmintos, se tomo las partes posteriores de hembra y macho de *Ascaris suum*, para incluir en el antígeno tanto aparatos reproductores masculinos como femeninos, que pudieran contener huevos, así como las vísceras.



En el caso de *Fasciola hepatica*, se utilizaron gusanos libres de detrito celular para no interferir en la elaboración de este antígeno. Este tipo de antígeno en periodo corto de tiempo aproximadamente de un mes comienza a degradarse, por lo que se apresuro a su utilización.

Los helmintos que se lograron procesar vivos fueron *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis* quienes se mantuvieron en un medio de cultivo el cual les permitiera subsistir, mediante cambios periódicos de este medio (Lehner y Sewell, 1980) que al virar, daba la constancia de la presencia de los productos metabólicos que liberan los parásitos al medio circundante, lo que se conoce como antígeno de excreción y secreción el cual se mantuvo libre de contaminación microbiológica que afectase su integridad.

La elección del antígeno de fluido vesicular de *T. crassiceps* fue debido por su alta sensibilidad, especificidad y por su facilidad de obtención en condiciones controladas de laboratorio (Fischer, 1994) ya que representa una alternativa confiable en la optimización del diagnóstico en el suero.

La adición de inhibidores fue para retardar la degradación de las proteínas y demás moléculas que conforman los antígenos y se encontraran íntegros a la hora de su utilización. Además la conservación de los antígenos a -20°C reduce al igual la degradación. Para una mejor conservación de estos antígenos en el futuro se menciona que la temperatura adecuada es de -80°C (Frontera E, 1998; Kennedy *et al.*, 1989) por lo que puede ser tomado como modelo en futuros estudios.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas de los antígenos obtenidos, se realizó por el método colorimétrico de Bradford, realizando la curva tipo presentada en la figura 34. Para los extractos totales antigénicos, se realizó una dilución de 1:10, debido a que presentaban una gran cantidad de proteínas y los valores de absorbancia no entraban dentro de los valores de la curva tipo, como se observa en el cuadro 2. Estos antígenos tienen una alta concentración de proteínas al obtenerse del parásito completo en comparación con los productos de excreción y secreción (PES) de *Toxocara canis* y *Trichinella spiralis* en donde la producción que ha sido estimada de PES es de 200 pg por día (Meghji y Maizels, 1986). Además el antígeno de fluido vesicular que también contiene muy poca cantidad de proteínas debido al tratamiento que se le da para obtenerlo.

8.4 PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LOS ANTÍGENOS

A los antígenos parasitarios obtenidos, se les realizó un corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida al 12% con la finalidad de observar su integridad y verificar que no se encontraran degradados, como se puede observar en la figura 35, en el corrimiento de los antígenos, se observan bandas separadas y otras muy grandes que posiblemente conformaban varias bandas de proteínas u otras moléculas, lo cual corroboró la alta complejidad proteica de los antígenos.



8.5 TITULACIÓN DE CONJUGADO Y DE SUERO

La determinación de estos parámetros fue de vital importancia ya que no se cuenta con estudios realizados en prociénidos, esto se logró utilizando sueros de ratones inmunizados con los antígenos a diagnosticar en este proyecto debido a que no era factible la inmunización de prociénidos por la dificultad de manejo en animales silvestres y cuidados para su manutención.

Revisando las graficas presentadas se observa que la dilución de suero y conjugado en la que se observó una diferencia entre el suero positivo y suero negativo fue 1:1000 de conjugado y 1:400 de suero en los distintos antígenos. Puesto que a una dilución mayor en el conjugado la sensibilidad disminuye y a una dilución menor la diferencia no es significativa. En lo que se refiere al posible problema de utilizar un control negativo de un mamífero diferente a la familia de los prociénidos para diagnosticar la presencia de anticuerpos en estos. Se utilizó un suero de mapache doméstico libre de parásitos (negativo) para tener un valor de referencia, con el fin de comparar absorbancias con el suero negativo de ratón para corroborar la existencia de diferencia significativa utilizando el ensayo antes mencionado.

En este estudio de comparación se aprecia una diferencia mínima entre ambos a la dilución de suero y conjugado elegidas como óptimas. Para que el valor fuese más representativo en la determinación de un diagnostico se recurrió a usar el de suero de mapache como negativo.

8.6 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS POR ELISA

Los métodos serológicos, en particular, el ELISA, provee oportunidades para la detección rápida de la infecciones que pueden estar cursando en un ser vivo, anteriormente estos estudios solo se realizaban en humano, pero recientemente ha habido un auge en la búsqueda de anticuerpos en animales para mostrar posibles fuentes de enfermedades zoonóticas que pudieran afectar a los humanos por ejemplo triquinosis, fasciolosis por citar algunas.

La implementación de ELISA en este proyecto permitió analizar un gran número de muestras de manera sencilla y sin mayor infraestructura para la búsqueda de la prevalencia existente de trematodos, cestodos y nematodos, utilizando como fuente de antígeno los helmintos seleccionados en este estudio para la búsqueda de anticuerpos contra antígenos que pudieran evidenciar contacto con dichos helmintos o algunos cercanos filogenéticamente a ellos que conserven biomoléculas antigénicas muy conservadas que generen una reacción cruzada con el antígeno utilizado.



8.6.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Ascaris suum* y *Toxocara canis*

Esta determinación se realizó para comprobar si los antígenos preparados eran reactivos contra los anticuerpos presentes en los sueros obtenidos. La búsqueda de anticuerpos en conjunto de estos dos ascáridos es debido a una aparente reacción cruzada, la cual se ha asociado a que comparten sitios antigénicos muy parecidos, que hacen que los reconozcan no solo los anticuerpos generados por ellos mismos si no por los anticuerpos generados por el otro nematodo (Méndez, 2010). Esto podría causar confusión en el diagnóstico y dar un falso positivo, al dar un resultado positivo aunque el suero no contenga los anticuerpos específicos para el parásito en cuestión. Buscando muestras de indicios de contacto de ambas familias con la fauna de estudio, se encontró reactividad durante todos los muestreos contra el antígeno de *Ascaris suum* en ambos prociénidos en un porcentaje de prevalencia de 22 % y 18% del total de muestras trabajadas, lo que sugiere pueda tratarse de una enfermedad endémica como lo es la baylisascariosis (Botero, 2004). Puesto que *Ascaris suum* posee similitud antigénica entre parásitos de la familia Ascarididae como *Ascaris lumbricoides* entre otros, la cual ha sido ampliamente registrada en artículos científicos (Loreille y Bouchet, 2003, Marquardt *et al.*, 2000, Yoshihara *et al.*, 2008, Martínez-Barbosa *et al.*, 2000) indica un posible contacto con la familia *Ascarididae* o algún otro helminto próximo evolutivamente que compartan biomoléculas antigénicas muy conservadas entre ellos y actúen como epitopos que generan la reacción cruzada.

La reactividad presente en los sueros contra el antígeno de *Toxocara canis* no se presentó, pese a que este helminto presente similar antigenicidad con las demás especies que conforman la familia *Toxocaridae* como *Toxocara cati* (De Savigny, 1979), el cual se ha encontrado en el parque en estudios taxonómicos en gatos domésticos, los cuales están en contacto con la fauna silvestre del lugar.

Por lo que se sospecho que pudiesen encontrarse en los sujetos de estudio, sin embargo no se detectó, por lo que posiblemente el helminto detectado serológicamente se trate de un ascárido que no presenta cruzamiento antigénico con la familia *Toxocaridae*. Para resolver esa duda sería pertinente hacer una purificación de estos antígenos para mejorar la sensibilidad del método de diagnóstico y plantear así una hipótesis en la que se determine el contacto con uno u otro helminto.



8.6.2 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Fasciola hepática* y *Taenia crassiceps*

La determinación de estos anticuerpos se baso en encontrar reactividad contra el antígeno de *Fasciola hepatica* como modelo de búsqueda de anticuerpos en suero contra trematodos perteneciente a la familia *Fasciolidae* u otros helmintos cercanos a su línea evolutiva como se ha descubierto recientemente con los turbelarios como *Dugesia sp.*, donde los anticuerpos contra un helminto reconocen de manera heteróloga las biomoléculas inmunogénicas del antígeno del otro gusano (Almanza, 2012) utilizando extracto total antigénico. Por lo que se trato de recrear con el modelo *Fasciola* buscar una reacción similar a la antes mencionada contra otros trematodos.

La búsqueda de anticuerpos de trematodos es una línea de investigación en continuidad a los hallazgos encontrados en coatíes del parque “La Venta” de un helminto de importancia zoonótica como lo es el trematodo *Ascocotyle (Phagicola) nana* (Hernández, 2006) que además también ha sido reportado en mapaches (Scholz, 2001) el cual es muy cercano a *Fasciola hepatica* puesto que ambos pertenecen a la subclase *Digenea* y su ciclo de vida es muy similar, para buscar la aún existencia de este trematodo en los prociénidos, se recurrió a una posible reacción cruzada con *Fasciola hepatica*, debido a la dificultad de obtener especímenes de *Ascotyle* por la normativa que actualmente existe en el parque que dificulta su adquisición.

Se observó que la reactividad entre el antígeno y los anticuerpos presentes en las muestras no mostró valores de absorbancia superiores o iguales al punto de corte establecido por lo que los anticuerpos no reconocieron a *Fasciola hepatica* por alguna de las siguientes razones, no se encontraban anticuerpos los cuales reaccionaran contra las moléculas antigénicas de trematodos de la familia *Fasciolidae* o bien tal vez se encuentre algún otro trematodo el cual no sea reconocido por estos anticuerpos como lo pudo ser *Ascotyle* que aunque sea un trematodo no pertenece a la misma familia ya que este pertenece a la familia *Heterophyidae* y puede que no tenga las biomoléculas inmunoantigénicas que reconozca la familia *Fasciolidae*.

Además se buscó la presencia de anticuerpos contra cestodos usando el modelo murino de *Taenia crassiceps* que ha proporcionado importantes avances en el diagnóstico de cisticercosis por lo que es ampliamente utilizado para evaluación de antígenos de la familia *Taeniidae* debido a que esta presenta grandes similitudes estructurales y antigénicas por ello es una fuente de antígeno para la búsqueda de anticuerpos que pudieran evidenciar contacto con miembros de esta familia (Sciutto, 1995). La reactividad mostrada contra este antígeno no mostró valores de absorbancia superior o iguales al punto de corte establecido en ELISA por lo que se descartó el contacto de los prociénidos con cestodos de la familia *Taeniidae* puesto que no reconocieron los anticuerpos presentes en el suero alguna parte antigénica de estos helmintos.



8.6.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Trichinella spiralis*

La determinación de anticuerpos se enfocó a la búsqueda de un probable contacto con la familia *Trichinellidae* u otro helminto semejante antigénicamente.

De acuerdo a los resultados presentados se observó durante los primeros cuatro muestreos una nula reactividad contra este antígeno, posteriormente durante los últimos muestreos se observó que algunos presentaron anticuerpos contra este antígeno en un porcentaje de prevalencia de 3.4% del total de muestras trabajadas de ambos prociénidos, por lo que pudiera ser una infección ocasional.

Pero sí se acepta que los anticuerpos detectados fueron sintetizados como respuesta a estímulos antigénicos provenientes del contacto con *Trichinella sp.* quiere decir que algo hizo que la helminto fauna de estos mamíferos fuera modificada, como lo pudo ser la depredación de ratas que tienen libre acceso al parque, o bien adquiriendo la infección por el consumo de carne de algún otro animal silvestre en el parque que posiblemente pueda fungir como hospedador de este parasito. Sería importante determinar si en verdad estos mamíferos están parasitados con este helminto puesto que estos mamíferos han llegado a ser consumidos como platillos exóticos por la población cercana al parque (de-la-Cruz, 2008), por lo que cobra una gran relevancia el estudiar más en el tema para garantizar que la población no se encuentre en peligro.

8.7 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE IET

Al haber obtenido tantas muestras positivas en ELISA se decidió observar que bandas diagnósticas eran las más reconocidas por estas muestras mediante la inmunoelectrotransferencia para confirmar si la reactividad del antígeno era existente en ambos métodos y tener una herramienta más para confirmar el contacto que tienen los prociénidos con la familia *Ascarididae* u otro helminto cercano a este. Como se observa en las inmunoelectrotransferencias descritas en la sección de resultados, no hay un reconocimiento específico de bandas, basándose en trabajos de Frontera, *et al.*, 2001 y Kennedy *et al.*, 1988, la zona que es reconocida por los anticuerpos es la que está entre 205 y 97 kDa común entre los ascáridos pertenecientes a la familia *Ascarididae* pero sin ser específica. El patrón de bandas más predominante encontrada en los muestras se encuentra entre la región de los 69 y 150 kDa, aunque es heterogéneo sin tener una zona específica de reconocimiento por lo que se puede decir que posiblemente el contacto sea con ascáridos por el parecido al bandeo en el patrón electroforético. Es tal la complejidad antigénica de los ascáridos que no se tienen muchos estudios sobre las glicoproteínas secretadas por la familia *Ascarididae* que actúan como epitopos en los inmunensayos.



Sin embargo, se ha demostrado la presencia de antígenos de los Sistemas de Grupo Sanguíneo ABO, P (Antígeno P1) y Glob en *Ascaris lumbricoides*, además de antígenos de superficie, los cuales han sido coincidentes con los epitopos expresados por sus hospederos, sugiriendo su participación en el fenómeno de mimetismo molecular (Ponce, 2002, 2006 y 2007). Debido a la complejidad proteica antes mencionada hace difícil el decir si pudo o no haber contacto de los prociñidos con *Baylisascaris* debido al reconocimiento inespecífico de bandas provisto por IET lo cual no asegura que se trate de este género, sin embargo de acuerdo al trabajo de Kazacos, (2009) el patrón mostrado por las IET realizados por este autor presenta cierta similitud con las bandas antigénicas vistas en este proyecto, por lo que el contacto con *Baylisascaris* no queda descartado.

Para confirmar la reactividad presentada en ELISA por parte de las muestras positivas al antígeno de *Trichinella spiralis* se recurrió a determinar si al igual existía por Western Blot, la mayoría de sueros reaccionaron contra el antígeno de excreción y secreción, identificando bandas cuyo peso molecular corresponde al de aquellas consideradas como diagnósticas del contacto con *T. spiralis*, es decir, aquellas con peso molecular relativo de 44, 49 y 55 kDa (Su y Prestwood, 1991; de-la-Rosa y Correa *et al.*, 1996), Las glicoproteínas con un peso molecular de 50-55 kDa son secretadas por los alfa-esticocitos, mientras que los de 48 kDa son secretados por las células beta (Silberstein y Despommier, 1984). Se encuentran dentro de estas bandas diagnosticas, los diferentes tipos de antígenos de la familia TSL, TSL-1 (45-100 kDa), TSL2 (45 kDa), TSL3 (45kDa) y TSL-5 (35 kDa), presentes en los productos de excreción y secreción de la larva muscular (Correa *et al.*, 1996). Muchas de estas proteínas esta glicosiladas con la beta-tivelosa, la cual se presenta de manera es única en el género *Trichinella* (Ellis *et al.*, 1997).

Para mejorar este estudio de búsqueda de anticuerpos sería importante tratar de realizar antígenos purificados como se dijo con anterioridad con los ELISA, pudiendo así tener mejores resultados en la búsqueda de bandas específicas.



8.8 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE AGLUTINACIÓN (REACCIONES FEBRILES)

Las reacciones febriles son pruebas que han venido a caer en desuso, sin embargo en muchos países en vías de desarrollo como México se siguen utilizando por ser pruebas baratas y rápidas, pero en países desarrollados son cada vez menos utilizadas por su pobre valor diagnóstico.

Estas pruebas se utilizaron como un estudio piloto para observar si los prociénidos eran presuntivos portadores de anticuerpos contra alguna de estas bacterias febriles, ya que como se sabe los animales silvestres y los insectos pueden ser portadores de algunas enfermedades graves que incluyen la rabia, el tétanos, la enfermedad de Lyme, la Fiebre Manchada de las Montañas Rocosas, salmonelosis entre otras. Las mordidas y los rasguños de animales, aunque sean pequeñas, pueden infectarse y diseminar bacterias a otras partes del cuerpo (Quiroz, 2005).

En estudios realizados por Jardine y colaboradores en 2011 se ha descrito que sea ha aislado distintos serotipos de *Salmonella* en animales salvajes en Ontario, Canadá, entre los cuales se encuentran los mapaches, por lo que se busco si en esta población de prociénidos pudiesen también estar presentes ayudados de aglutinaciones.

Las pruebas consistieron en detectar en suero la presencia de "anticuerpos" o "células de memoria", las cuales indicaran contacto previamente con diferentes tipos de bacterias, o bien que se había cursado una enfermedad.

La presencia de *Salmonella typhi* se determinó mediante la aparición de aglutininas O y H en el suero como respuesta a la estimulación creada por los antígenos somáticos O y flagelares H de la *Salmonella*. El Ag VI de superficie no suele emplearse en el diagnóstico serológico porque los Ac que produce tienden a desaparecer de la sangre inmediatamente después de la mejoría clínica. Las aglutininas O aparecen con precocidad, alcanzan títulos bajos y desaparecen rápidamente; las H aparecen más tarde, alcanzan títulos elevados y se conservan más tiempo, pudiendo demostrarse títulos bajos durante más de un año (House, 2001). El determinar la presencia para *Salmonella paratyphi* ha ido en desuso puesto que solo es identifica sí se cursa una fiebre paratifoidea del tipo A o B mediante la aparición de aglutininas contra el antígeno Paratyphi A (Flagelar a) y antígeno Paratyphi B (Flagelar B 1,2) que generalmente son raras y de un curso más benigno que la fiebre tifoidea (Zailani, 2003).

Debido a la falta de especificidad de las reacciones anteriores, se interpretaron los resultados en el contexto clínico de los animales como sanos. Los cuales no presentaban ningún signo de enfermedad, además los títulos presentados fueron bajos y entraban dentro del rango normal de aglutininas, considerando que el rango normal es hasta un título de aglutininas de 1:80 en humanos y se considero el mismo para animales.



Al buscar un posible contacto con *Brucella* se buscan anticuerpos tanto IgG como IgM, donde los títulos pueden persistir en cifras bajas durante meses o años, un título mayor a 1:160 de aglutininas indica un caso de brucelosis crónica después de 3 semanas de infección.

Títulos de hasta 1:40 se consideran normales (Lucero, 2007). Lo observado experimentalmente es que no hubo aglutinación contra este antígeno por ende se descarta el contacto con el mismo.

Los anticuerpos detectados para *Proteus* OX-19 y rickettsias son del tipo IgM que aparecen entre el 5to y 10mo día de aparición de los síntomas por lo que es poco sensible y específica (Eremeeva, 1994). Los resultados obtenidos fueron de nula aglutinación, lo que indica que no hay presencia de aglutininas en suero aunque como es poco específica se necesita apoyo de pruebas confirmatorias (fijación del complemento, hemaglutinación indirecta).

9. CONCLUSIONES

1. Se logró obtener una cantidad representativa de sueros de ambas especies un total de 231 sueros, 171 de coatíes y 60 de mapaches durante el periodo comprendido del año 2009 a 2011 de manera azarosa.
2. Con el fin de obtener los antígenos para el inmunodiagnóstico de las familias de helmintos que posiblemente pudieran parasitar a los procionidos se recurrió al uso de los antígenos para diagnóstico de helmintiasis humanas que pueden ser utilizados como marcadores de base para detectar la búsqueda de anticuerpos de grandes taxa (orden, familia) aprovechando reacciones cruzadas por parte de epitopos conservados a lo largo de toda la filogenia de un grupo en particular.
3. Se obtuvieron las condiciones óptimas de dilución de suero 1:400 y conjugado 1:1000 que garantizaron una reactividad perceptible al buscar anticuerpos contra los antígenos de estudio.
4. Los inmunoensayos realizados, demostraron la presencia de anticuerpos contra ascáridos y trichinellidos en un 20 y 3.4 % respectivamente del total de muestras obtenidas. Lo cual sugiere un posible contacto con estos helmintos, pudiendo o no estar parasitando a los sujetos de estudio.
5. En lo que se refiere a la búsqueda de aglutininas mediante reacciones de aglutinación en suero no se encontraron títulos que aseveren contacto con bacterias asociadas al cuadro febril.



10. PERSPECTIVAS

- a) Realizar más estudios taxonómicos de la helmintofauna de los prociénidos para saber si pueden ser un potencial peligro para estos y para los que interactúan con ellos.
- b) Realizar estudios inmunológicos, probando esta vez antígenos purificados para buscar los anticuerpos homólogos que arrojen mejores resultados en el diagnóstico.
- c) Llevar a cabo la búsqueda de anticuerpos contra lo diagnosticado en este proyecto a personal laboral del parque que se encuentra en contacto con los prociénidos para saber si pueden estar en peligro de adquirir una enfermedad zoonótica.
- d) Siguiendo con la línea de investigación de bacterias sería más conveniente seguir mediante la siembra de hisopado rectales de los animales en medios de cultivo bacteriológicos, lo cual garantizaría resultados más confiables ya que con ninguna de las reacciones febriles se puede hacer un diagnóstico definitivo de cualquier enfermedad comprendida en ellas.



11. ANEXO

Solución amortiguadora de fosfatos (PB) 10X

NaH₂PO₄ ·H₂O-----2.62 g

Na₂HPO₄ anhidro-----11.50 g

H₂O destilada -----1000 mL

Medir 800 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitado.

Al vaso de precipitados se le agregan 2.62 g de NaH₂PO₄ ·H₂O (fosfato de sodio monobásico y se disuelve.

Pesar 11.5 g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico anhidro), se adicionan al vaso de precipitados y se disuelve (ésta sal tarda en disolverse).

La disolución se afora a 1000 mL con agua destilada.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.2)

PB 10X-----100 mL

NaCl-----8.75 g

H₂O destilada-----900 mL

En una probeta se miden 100 mL de PB 10X (Sol. 1) y se vacían en un vaso de precipitado.

En la misma probeta medir 900 mL de agua destilada, se agrega al vaso de precipitado que contiene PB 10X y se mezcla.

Agregar 8.75 g de NaCl (cloruro de sodio) y disolver.

Ajustar el pH de la solución a 7.2 con HCl 1N o con NaOH 1N.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 37°C.

Solución de lavado (PBS Tween 0.05%)

PBS pH 7.2-----1000 mL

Tween 20-----500 µL

A un litro de PBS pH 7.2 se agregan 500 µL de Tween 20 y se disuelve por agitación.

Envasar en un frasco de vidrio, etiquetar y guardar a 4°C.

Solución estándar.- Albúmina Sérica Bovina (ASB) 1 mg/mL

ASB-----10 mg

H₂O destilada-----10 mL

Disolver 10 mg de ASB en 5 mL de agua destilada.

Aforar la solución en un matraz volumétrico a 10 mL

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.



SOLUCIONES DE INHIBIDORES ENZIMÁTICOS

PMSF 100 mM (Fenilmetil sulfonil fluoruro) -----174 mg

Isopropanol o etanol al 70%-----10 mL

Disolver con agitación constante. Mantener a -20 °C en frasco etiquetado.

TLCK 5X (N-a-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona) -----5 mg

H₂O destilada-----1 mL

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg /mL. Conservar a -20°C en frasco etiquetado.

TPCK 5X (N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona) -----5 mg

Metanol-----1 mL

Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg /mL, al momento de usarla. Se conserva a -20°C en frasco etiquetado.

PMSF (fenil metilsulfonilfluoruro) al 0.06%

PMSF-----6 mg

Isopropanol o etanol al 70 %-----1 mL

Disolver con agitación constante. Mantener a -20 °C en frasco etiquetado.

Desoxicolato de sodio (DOC) al 10 %

DOC-----1 g

Tris-base 10 mM pH 8-----10 mL

Disolver con agitación constante. Mantener a temperatura ambiente.

PBS estéril + antibióticos

PBS estéril-----100 mL

Mezcla de antibióticos (fungizona, amfotericina B 1mL/100 ml) --1 mL

Conservar a -20°C en frasco etiquetado.

SOLUCIONES PARA ELISA

Solución Amortiguadora de Carbonatos 0.1M pH 9.6

Na₂CO₃-----3.18 g

NaHCO₃-----5.86 g

H₂O destilada-----1000 mL

En una probeta medir 800 mL de agua destilada y vaciarlo en un vaso de precipitado.

Agregar 3.18 g de Na₂CO₃ (carbonato de sodio) y disolver.

Agregar 5.86 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y disolver.



Se ajusta el pH a 9.6 con HCl 1N o NaOH 1N y se afora a 1000mL.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Leche descremada-PBS-Tween 20

Leche Sveltes -----5 g

PBS-Tween 20 al 0.05% aforar-----100 mL

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Hidróxido de Sodio 1 N.

NaOH-----40 g

H₂O destilada-----1000 mL

Disolver en baño de hielo y con mucho cuidado, ya que la reacción es exotérmica.

Envasar en un frasco, etiquetar y mantener a temperatura ambiente.

Buffer Citrato-Fosfato 75 mM, pH 5.0

Ácido cítrico -----1.92 g

Na₂HPO₄-----2.85 g

H₂O destilada-----100 mL

En una probeta medir 80 mL de agua destilada y vaciarlo en un vaso de precipitado.

Agregar 1.92 g de Na₂CO₃ (carbonato de sodio) y disolver.

Agregar 2.85 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y disolver.

Ajustar el pH a 9.6 con HCl 1N o NaOH 1N y se afora a 100 mL

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Sustrato ELISA

Buffer Citrato-Fosfato-----10 mL

Orto-Fenil-Diamina -----4 µg

H₂O₂ 3%-----12 µL

NOTA: Debe prepararse al momento de usarse.

Solución H₂SO₄ 2N

H₂SO₄ concentrado-----53.3 mL

H₂O destilada aforar-----1000 mL

Agregar lentamente el ácido al agua, manteniendo el matraz en baño de hielo.

Envasar en un frasco de vidrio, etiquetar y guardar a 4°C.



SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS Y ELECTROTRANSFERENCIA

Tris-Base 2M pH 8.8

Tris-base-----60.55 g

H₂O destilada-----250 mL

Medir 250 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitado.

Pesar 60.55 g de Tris-Base, agregar al vaso y disolver.

Ajustar el pH de la solución a 8.8 con HCl 1N y NaOH 1N.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Tris-HCL 2M pH 6.8

Tris-HCl-----79 g

H₂O destilada-----250 mL

Medir 250 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitado.

Pesar 79 g de Tris-HCl, agregar al vaso y disolver.

Se ajusta el pH de la solución a 6.8 con HCl 1N y NaOH 1N.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Acrilamida-Bisacrilamida 30%

Acrilamida-----29.2 g

Bisacrilamida-----0.8 g

H₂O destilada-----100 mL

Medir 70 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitado.

Agregar 29.2 g de acrilamida al vaso de precipitados y disolver.

Agregar 0.8 g de bis-acrilamida a la solución anterior y disolver.

Aforar con agua destilada a 100 mL en un matraz aforado.

La solución se envasa en un frasco de vidrio ámbar, se etiqueta y se guarda a 4°C.

SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%

SDS-----10 g

H₂O destilada-----100 mL

Medir 60 mL de agua destilada en una probeta.

Agregar a la probeta 10 g de SDS y disolver.

Aforar a 100 mL con agua destilada y guardar a temperatura ambiente en fracciones de 20 mL.

NOTA: Utilizar guantes y cubre boca.

**APS (Persulfato de amonio) al 10%.**

APS-----50 mg

H₂O destilada-----450 µL

Pesar 50 mg de APS, agregarlo a 450 µL de agua destilada y disolver.

Envasar en un eppendorf, etiquetar y guardar a 4°C.

NOTA: Esta solución se prepara al momento de su uso. Si no se prepara se puede adicionar una pizca (unos granitos).

Tris-glicina 5x

Tris-base -----12 g

Glicina-----57.6 g

H₂O-----1000 mL

Medir 700 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitados.

Agregar 57.6 g de Glicina y disolver.

Agregar 12 g de Tris- Base y disolver.

La solución se afora a 1000 mL con agua destilada.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Regulador de electroforesis (Tris-glicina 5X pH 8.3) Solución de corrida.

Tris-glicina 5x-----200 mL

SDS al 10%-----8 mL

H₂O destilada-----1000 mL

Medir 500 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitado.

Medir 200 mL de tris- glicina 5x y adicionar a la solución.

Medir 8 mL de SDS al 10%, adicionar a la solución disolver.

Ajustar el pH de la solución a 8.3 con HCl 1N o NaOH 1N.

Aforar a 1000 mL con agua destilada.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.

Degradador de Muestra (Cóctel).

EDTA-----37 mg

Glicerol-----5 mL

SDS al 10 %-----5 mL

Tris-HCl 2 M pH 6.8-----1.25 mL

Azul de bromofenol-----“una pisca”

H₂O destilada-----50 mL

Medir 40 mL de agua destilada y vaciar en un vaso de precipitados.



Pesar 37 mg de EDTA, agregar al vaso de precipitado y disolver.

Agregar 1.25 mL de Tris-HCl 2 M pH 6.8 y disolver.

Adicionar 5 mL glicerol (glicerina) y disolver.

Adicionar 5 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) y disolver.

Adicionar con un aplicador de madera suficiente azul de bromofenol para que la solución adquiera un color azul oscuro.

Aforar la solución a 50 mL con agua destilada.

Por último, la solución se guarda en fracciones de 10, 5 y 1 mL a -20 °C.

Azul de Coomassie 0.2%

Azul de Coomassie-----200 mg

Metanol absoluto-----50 mL

Ac. Acético-----5 mL

H₂O destilada-----45 mL

Disolver con agitación constante. Mantener a temperatura ambiente en frasco etiquetado.

Decolorante de geles

Ácido acético glacial-----5 ml

Metanol absoluto-----50 ml

H₂O destilada-----45 ml

Mantener a temperatura ambiente en frasco etiquetado.

Rojo de Ponceau S al 0.2%.

Rojo de Ponceau S-----200 mg

Ac. Tricloro acético (ATA) al 0.3%-----100 mL

Pesar 0.3 g de ATA y disolver 100 mL de agua destilada.

Mantener a temperatura ambiente en frasco etiquetado.

Regulador de Transferencia Tris 0.025 M, Glicina 0.125 M, pH 8.3 Metanol al 20% v/v

Tris-base 2 M pH 8.8-----12.5 mL

Glicina-----14.49 g

Metanol-----200 mL

H₂O destilada-----800 mL

Medir 800 mL de agua destilada, agregar 14.49 g de Glicina y disolver.

Adicionar 12.5 mL a la solución.

Adicionar 200 mL de Metanol.

Envasar en un frasco, etiquetar y guardar a 4°C.



Sustrato de Inmunoelctrotransferencia

4 -cloro-1-naftol-----	50 µg
Metanol-----	10 mL
H ₂ O ₂ 0.3% -----	50 µL
PBS pH 7.2-----	50 mL

Disolver con agitación constante.

Debe prepararse al momento de usarse.

PRECAUCION: Al preparar esta solución se debe usar guantes, bata y cubre boca.



12. BIBLIOGRAFÍA

1. - **Abbas Litchman** (2003). *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. El Sevier Science.
2. - **Acha P.N., Szyfres B., (Pan American Health Organization [PAHO])**. (2003). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. Volume 3. Parasitoses. 3rd ed. Washington DC: PAHO. Scientific and Technical Publication No. 580. *Visceral larva migrans and toxocariasis*; 305-311.
- 3.- **Allen J.E., Maizels R.M.** (1997). *Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?* Immuno. Today; 18:387-92.
4. - **Almanza Gonzalez Alfredo**. (2012). *Búsqueda de antígenos de reactividad cruzada entre los platelmintos fasciola hepatica y dugesia sp. evaluada por inmunoensayos* Tesis de Licenciatura QFB. InDre, México D.F.
5. - **Baig A. S. A., Rana, M. S., Zaki M. T. & Khan K.** (2007). *Helminth parasitic load in soil of northern Lahore*. *Int. J. Environ. Res.* 1(3): 248-251.
- 6.- **Barriga O. O.** (1988). *A critical look at the Importance, prevalence and control of Toxocariasis and the possibilities of immunological control*. *Vet. Parasitol.* 29: 95-234.
- 7.- **Beauregard S.G.** (2000). *Parque Museo La Venta. Kuxulkab'*. Revista de divulgación. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. 7(14):61-67.
8. - **Beaver P. Ch., Jung R.C., Wayne C.E.** (2003). *Parasitología clínica de Craig Faust* (3^a ed.). México DF: Ed. Masson.
9. - **Becerril M.** (2008). *Parasitología Médica* 2^a ed. México: Mc GrawHill.
10. - **Botero David, Restrepo M.** (2004). *Parasitosis humanas*. 4^a Edición, Ed. CIB. México D.F., pp: 93 -99.
11. - **Caballero S. M. L.** (1998). *Inmunología de la infección por helmintos*. Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica, 13(6): 297-313.
12. - **Caballero y Caballero E.** (1948). *Estudios helmintológicos de la región oncocercosa de México y la República de Guatemala*. 4^a parte. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. Méx.* 19 (4): 137-151.
13. - **Castro J. M., Santos S. V., Milanelo L. Godoy, S. N.** (2002). *Ocorrencia de Dioctophyma renale en quatis Nasua nasua, do parque ecológico tieté, Sao Paulo, Brazil*. XXV Resumos do III simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos. Nov. 2000. 463 pp.
14. - **Carrada-Bravo T.** (2007). *Fasciola hepatica: Ciclo biológico y potencial biótico*. Revista Mexicana de patología Clínica, 54(1): 21-27.



- 15.- **Correa D., de-la-Rosa J.L., Ortega-Pierres G.** (1996). *Trichinellosis: human epidemiological data in Mexico from 1943 to 1995*. In: Proc. Ninth Int. Conf. Trich. Eds. G. Ortega-Pierres, R. Gamble, F. van-Knapen and D. Wakelin. México. CINVESTAV, IPN. pp. 519-523.
- 16.- **de-la-Cruz-Felix Himmler Keynes.** (2008). *Cacería de subsistencia de mamíferos silvestres en dos sierras del parque estatal de la sierra, Tabasco*. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales. División Académica de Ciencias Biológicas. UJAT. Tabasco.
- 17.- **de-la-Rosa Arana J.L., Priego-Gómez Alberto.** (2000) Capítulo VI. *Triquinelosis en: Zoonosis Manual de Procedimientos para el Diagnostico de Laboratorio*, México D.F. 113-120.
- 18.- **de-la-Rosa Arana J.L., Campos Rodríguez C., Rivera Aguilar Víctor, Escobar Gutiérrez Alejandro** (2012) *Comparative effects of levamisole, Staphylococcus, and Freund's adjuvant on rat immunization with excretory and secretory antigens of Trichinella spiralis muscle larvae*, Parasitology research, Editorial Springer.
- 19.- **De Savigny D. H., Voller A y. Woodruff A.W.** (1979) *Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay*. Journal of Clinical Pathology 32 (3): 284-288.
20. - **Despommier D.D.** (1983). *Biology, In Trichinella and trichinosis*, W.C. Campbell, ed. (New York: Plenum Press). pp. 75–151.
21. - **Despommier D.D, Gold A.M., Buck S.W., Capo V., Silberstein D.** (1990). *Trichinella spiralis: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells*. Exp Parasitol.71(1):27-38.
22. - **Dupouy-Camet J.**(2000) *Trichinellosis: a worldwide zoonosis*. Vet. Parasitol.93:191-200.
23. - **Eiguer T., Caffer M. I.**(1988). *Taxonomía de Salmonella*. Rev. Arg. Microbiol. 20: 151-154.
24. - **Ellis L.A., McVay C.S., Probert M.A., Zhang J., Bundle D.R., Appleton J.A.**(1997). *Terminal beta-linked tyvelose creates unique epitopes in Trichinella spiralis glycan antigens*. Glycobiology. 7(3):383-90.
- 25.- **Eremeeva M.E., Balyeva N.M., Raoult D.** (1994). *Serological response of patients suffering from primary and recrudescant typhus: Comparison of complement fixation reaction*. Clin. Diagn. Lab. Immunol.1:318.
26. - **Espino A.M., Duménigo B., Fernández R., Finlay C.** (1987). *Immunodiagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory secretory products*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37: 605-608.



27. - **Evans R.H.** (2002). *Anesthesia and containment of Raccoons and other family members (Carnivora, Procyonidae)* in Zoological Restraint and Anesthesia. D. heard (Ed.), International Veterinary Information Service (USA).
28. - **Fabre M.V., Beiting D.P., Bliss S.K., Appleton J.A.**(2009) *Immunity to Trichinella spiralis muscle infection.* Vet.; 159(3-4):245-8.
- 29.- **Fischer C., Nosratian R., Habtemichael N., Tolle R., Riemenschneider V., Geyer E.**(1994). *Preparation and sequence analysis of Taenia crassiceps metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis.* Trop. Med. Parasitol. 45:324-8.
30. - **Flores T.A.** (2005). *La fasciolosis Bovina.* Revista Virbac. Salud Animal México, 6: 1-8.
31. - **Forsyth Adrian.** (1999). *Mammals of North America: temperate and arctic regions.* Firefly Books. Willowdale, Ontario. (350 pp.).
- Fowler M.E.**(1978). *Carnivora. In: Restraint and Handling of Wild and Domestic Animals.* Ames: Iowa State University Press; 201-213.
32. - **Fredes F.** (2004). *La fasciolosis animal y humana.* Mon. Electr. De Patología veterinaria. Chile.1: 38-67.
- 33.- **Frontera E., Serrano F., Carrón A., Mora J.A., Perez J.E.** (2001). *Caracterización antigénica de Ascaris suum mediante SDS-PAGE y Western blotting.* Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.16(1): 153-163.
34. - **Fuentes P. E.** (2001). *Uso de recursos alimenticios por monos aulladores (Alouatta palliata) en el Parque La Venta, Tabasco.* Tesis profesional. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. 44 pp.
35. - **Geenen P.L., Bresciani J., Boes J., Pedersen A., Eriksen L., Fagerholm H-P. & Nansen P.** (1999). *The morphogenesis of Ascaris suum to the infective third stage larvae within the egg.* J. Parasitol.85 (4), 616-22.
- 36.- **Gómez M., F. A. Rojo J., Guerrero.** (1999). *Filariatosis.* Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
37. - **Grencis R.K., Riedlinger J. and Wakelin D.** (1985). *L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to Trichinella spiralis in mice.* Immunology 56:213-218.
38. - **González Tania Soledad** (2009). *Valoración serológica de antígenos de Ascaris suum para el inmunodiagnóstico de la ascariosis humana.* Tesis de Licenciatura QBP. InDre, México D.F.
39. - **Gottstein B., Pozio E., Nöckler K.** (2009). *Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis.* Clin. Microbiol. Rev; 22(1): 127-145.



40. - **Gutiérrez María de los Ángeles** (2008). *Evaluación de antígenos de Fasciola hepatica para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis humana*. Tesis de Licenciatura QBP. InDre, México D.F.
41. - **Hafeez M. D.** (2003). *Helminth parasites of public health, importance-trematodes*. J. Parasitol.27(2): 69-75.
42. - **Hans Krook, Connor R., Harwood J.** (2006). *La gran enciclopedia de los mamíferos*, Ed. Diana-Libsa. Madrid, España.
- 43.- **Hernández- Tario Eriane., López- Jiménez Serapio.** (2006). *Presencia de Ascocotyle (Phagicola) nana, en la población en semicautiverio de coatíes (Nasua narica) del Parque Museo La Venta, Villahermosa Tabasco*. Laboratorio de Parasitología. División Académica de Ciencias Biológicas. UJAT. Tabasco.
44. - **House D., Wain J., Ho V.** (2001). *Serology of typhoid fever in an area of endemicity and its relevance to diagnosis*. Journal of Clinical Microbiology; 1002-1007.
- 45.- **Janeway C.** (2001). *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 5th Ed. Garland Publishing.
46. -**Jardine Claire, Reid-Smith Richard J.,Nicol Janecko, Allan Mike.**(2011). *Salmonella in raccoons (Procyon lotor) in southern Ontario, Canada*. Journal of Wildlife Diseases. 47(2). 344–351
47. - **Kazacos K.R.** (2001). *Baylisascaris procyonis and related species*. In: Samuel WM, Pybus MJ., Kocan AA, editors. Parasitic diseases of wild mammals. 2nd ed. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press: 301-41.
48. - **Kennedy M. W., Qureshi F., Fraser E. M., Haswell-Elkins M.R., Elkins D.B., Smith H.V.** (1989). *Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites Ascaris lumbricoides, Ascaris suum, and Toxocara canis*. Clin Exp Immunol. 75(3): 493–500.
49. - **Krause R.M.** (1992). *The origins of plagues: old and new*. Science. 257:1073–1078.
50. - **Larralde C., Sotelo R., Montoya G., Padilla T., Govezensky M., and Sciutto E.** (1990). *Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigen from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia Solium*. Arch. Pathol. Lab. Med. 144: 926-928.
51. - **Lehner R.P., Sewell M.M.H.** (1980). *A study of the antigens produced by adult Fasciola hepatica maintenance in vitro*. Parasite Immunol. 2: 99-109.
- 52.-**Lequin R.** (2005). *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin. Chem. 51 (12): 2415–8.



53. - **Loos-Frank B., Zeyhle E.**, (1982). *The intestinal helminths of the red fox and some other carnivores in southwest Germany*. Z Parasitenkd. 67: 99-113.
- 54.- **Loreille O., Bouchet F.** (2003). *Evolution of Ascariasis in humans and pigs: Multidisciplinary approach*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; 98(Suppl. I): 39-46.
55. - **Lucero N.E., Ayala S.M., Escobar G.I., Jacob N.R.** (2007). *The value of serologic tests for diagnosis and follow up of patients having brucellosis*. Am. J. Infect. Dis. 3(1):27-35.
56. - **Luster A.** (2002). *The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity*. Curr. Op. Immunology;(14):129-36.
57. - **Machado F. D. A.** (1940). *Pesquisas helmintológicas realizadas no Estado de Mato Grosso-Acanthocephala*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 25(3): 593-601.
58. - **Marcel R., Díaz A., Arteaga E., Finlay C.M., Sarracent J.** (2002). *Possive protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES – 78 MoAb)*. Parasite Immunology, 24(2): 103- 108.
59. - **Marquardt C. William, Demaree S. Richard, Grieve B. Robert.** (2000). *Parasitology vector biology*. Second Edition, Ed. Harcourt Academic Press, pp: 431-438.
60. - **Martínez-Barbosa I.** (2000). *Inmunoepidemiología sobre ascariasis en escolares de la Ciudad de México*. Revista Mexicana de Patología Clínica, Enero-Marzo 2000, 47(1): 20-25.
61. - **Miller M. W.** (1999). *Filariosis cardiaca*. En: Morgan, R. V. 1999. *Clínica de pequeños animales*. 3ª ed. Harcourt Brace, Madrid. España.
62. -**Meghji M. and Maizels R.M.** (1986). *Biochemical properties of larval excretory-secretory(ES)Glycoproteins of the parasitic nematode Toxocara canis*. Molecular and Biochemical Parasitology.18: 155-170.
63. - **Méndez Martha Eugenia** (2010). *Identificación de antígenos de reactividad cruzada entre Ascaris suum y Toxocara canis por inmunoensayos*. Tesis de Licenciatura QBP., InDre, México D.F.
64. - **Morales G. A. y Pino de M. L.** (2004). *Fasciola hepatica y distomatosis hepática bovina en Venezuela*. Red de Helminología de FAO para América Latina y el Caribe. Disponible en <http://cni.inta.gov.ar/helminto>.
65. - **Morse S.S.** (1993). *Examining the origins of emerging viruses*. In: Morse S.S. (Ed.) *Emerging Viruses*. New York: Oxford University Press.
66. - **Murrell K. D., Eriksen L., Slotved H. -C. & Rasmussen T.** (1997). *Ascaris suum: a revision of its early migratory path and implications for human ascariasis*. J. Parasitol. 83(2), 255-260.



67. - **Murrell K.D., Pozio E.** (2000). *Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly*. Int. J. Parasitol. 30: 1339–1349.
68. - **Neal B.J.** (1960). *Two parasites from coati in southern Arizona*. J. Parasitol. 46:647.
69. - **Parola P., Socolovschi C., Jeanjean L., Bitam I., Fournier P-E.** (2008) *Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses*. PLoS Negl Trop Dis 2(11).
- 70.- **Pereira V.** (2008). *Enfermedades emergentes y vida silvestre*. Jornada Nacional de Zoonosis y enfermedades emergentes y reemergentes. Bogotá, Colombia.
71. - **Peña M.T.** (2001). *Técnicas de diagnóstico de Trichinella Spiralis*. Red de Helminología de FAO para América Latina.
72. - **Perrigrove J. G., Marshall F. A., Artis D.** (2008). *On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and response to helminth parasites*. Cellular Microbiology, 10(9): 1757-1764.
73. - **Polizopoulou Z. S., A. F. Koutinas M. N. Saridomichelakis M. N., Patsikas L. S., Leontidis N. A., Roubies A. K. Desiris.** (2000). *Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with Dirofilaria immitis in northern Greece*. Vet. Rec. 146: 466-469.
74. - **Ponce -de -León P., Valverde J. P.**(2002). *System epitopes in Ascaris lumbricoides*. Rev Inst Med Trop. S Paulo; 44 (2): 115-6.
75. - **Ponce –de- León P., Foresto P., Valverde J.** (2006) *Ascaris lumbricoides: heterogeneidad en la expresión de epitopes ABO*. Rev. Invest. Clín.; 47: 385-93.
76. - **Ponce –de- León P., Foresto P., Valverde J.** (2007) *Ascaris lumbricoides: Capacidad Inhibitoria relacionada al Antígeno P₁*. Acta Bioquím. Clín. Latinoam.; 41: 225-8.
77. - **Popoff M.Y., Le Minor L.** (2001). *Formules antigeniques des serovars des Salmonella*. Who collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris.
78. - **Pozio E.** (2001). *New patterns of Trichinella infections*. Vet. Parasitol. 98:133-148.
- 79.- **Prescott L. M.** (1998). *Microbiología*. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid, España.
80. - **Pritchard D.I.** (1993). *Immunity to helminths: is too much IgE parasite-rather than host-protective?* Parasite Immunology; 15: 5-9.
81. - **Pumarola A.** (1987). *Salmonella*. *Microbiología y Parasitología Médica*. 2da edición. Salvat Editores: 37:422-430.
82. - **Quiroz Hector** (2005). *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domesticos*. Editorial Limusa. 235- 245.



83. - **Rosa A., M. Ribicich G. T., Pérez A., Betti N., Basso G., Sigal C. Volpin, R. Hallu.** (2000). *Dirofilariosis canina. Tratamiento con melarsomina.* Rev. Med. Vet. Ag. 81: 368,371-372.
84. - **Russell D.A., Castro G.A.** (1985). *Anaphylactic-like reaction of small intestinal epithelium in parasitized guinea-pigs.* Immunology. 1985 Mar; 54(3):573–579.
- 85.- **Salgado M. G. y Cruz, R. A.** (2002). *Porrorchis nickoli n. sp. (Acanthocephala: Plagiorhynchidae) para mamíferos del sudeste de México, primer reconocimiento de incidencia de Porrorchis en el hemisferio occidental.* J. Parasitol. 88(1): 146-152.
86. - **Samudio R., Kays R., Cuarón A.D., Pino J.L. & Helgen K.** (2008). *Nasua narica.* In: IUCN 2012. IUCN. Red list of threatened species. Disponible en www.iucnredlist.org.
87. - **Schimidt D. Gerald, Roberts S. Larry., Foundations of Parasitology.**(2005). 7th Ed., McGraw-Hill, pp: 431-437.
88. - **Scholz T., Aguirre M. L., Salgado M.** (2001). *Trematodes of the family Heterophyidae (Digénea) in Mexico: a review of species and new hosts and geographical records.* Journal of Natural History. 35 (12): 1733-1772.
- 89.- **Sciutto E., Fragoso G., Baca M., De la Cruz V., Lemus L., Lamory E.** (1995). *Depressed T cell proliferation associated with susceptibility to experimental Taenia crassiceps.* Infect. Immu. 63:2277-2281.
90. - **Sivigila.** (2004). *Fiebre amarilla Colombia 2003– 2004. Sistema de vigilancia en salud pública.* Boletín epidemiológico semanal. Enero 18 – 24 de 2004.
- 91.- **Sørensen M.F., Pedersen M.H., Jensen P.B.** (2001). *Salmonella.* Disponible en <http://www.bioan.dk/Projekter/salmonella.htm>.
92. - **Sorvillo F., Ash LR., Berlin O.G., Morse S.A.** (2002). *Baylisascaris procyonis: an emerging helminthic zoonosis.* Emerg. Infect. Dis. 8:355-9.
93. - **Stewart G.L., Despommier D.D.; Burnham J., and Reins K.** (1987). *Trichinella spiralis: Behavioral, structural, and biochemical studies on larvae following exposure to components of the host enteric environment.* Exp. Parasitol. 63: 195-204.
94. - **Steffan P.E.** (1987). *Experimental infection with Trichinella spiralis in rabbits and guinea pigs. Studies on inoculation technique, dianostic methods, pathogenesis and anthelmintic efficacy of ivermectin.* Final Report on Minor Subject, National Veterinary Laboratory, Copenhagen, Denmark, 85 pp.
95. - **Stringfield C.** (2007). *Baylisascaris neural migrans in zoo animals.* En: Fowler, M, Miller RE, editors. Zoo and wild animal medicine: current therapy, Vol 6. St. Louis, MO: Saunders Elsevier; 284-286.



96. - **Su X. and Prestwood A.** (1991). *A dot ELISA mimicry western blot test for the detection of swine trichinellosis.* J. Parasitol. 77: 76-82.
- 97.- **Tay Rodríguez, Gutiérrez, López, Romero.** (1993). *Microbiología y Parasitología Médicas.* 1a Ed. Méndez Editores. México, D.F. pp. 3196-3205.
98. - **Travassos L.** (1917). *Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira: VI Revisão dos acantocéfalos brasileiros, parte I Gigantorhynchidae Hamann, 1892.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. (9): 5–62.
99. - **Travassos L.** (1923). *Gigantorinchideos novos.* Folha Médica. 2(12): 11-12.
100. - **Untama F. J. L.** (2006). Respuesta inmune frente a parásitos. *Boletín Inmunológico grupo de Investigación en Inmunología,* 4(2): 3-12.
101. - **Van A. C. E., Wagner J. E., Ronald N.C.** (1974). *Dibothriocephalus latum and Mesocestoides infestation of a coati-mundi.* Journal of Zoo. Animal Medicine, 5(1):8-10.
102. - **Vicente J. J, Rodríguez H. O., Gomes D. C., Pinto R. M.** (1997). *Nematóides do Brasil. Parte V: nematóides de mamíferos.* Revista Brasileira de Zoologia, 14, 1–452.
103. - **Vieira. F. M., Luque, J. L., Pereira C. M.** (2008). *Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil.* Zootaxa, 1721: 1–23.
104. - **Walker D.H., Dumler J.S.** (1997). *Rickettsial infections* En: Connor DH, Chandler FW, Eds. Pathology of Infectious Diseases. Vol 1 Standford, Conneticut: Appleton & Lange. 789-799.
105. -**Wilson Don, Reeder DeeAnn,** (2005). *Mammal species of the world.* (3ª edición). Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2 vols. (2142 pp.).
106. - **Wolfgang K., Joklik Hans Zinsser.**(1994). *Microbiología.* Edit. Médica panamericana, 20ª Ed. México, D.F.
107. - **Yoshihara S., Hattori J., Nishizono K., Kawamura A., Shimozaki K., Nishida Y., Oda K., Tsuji N., Hirayama N.**(2008). *Hepatic Lesions caused by Migrating Larvae of Ascaris suum in chickens.* J Vet. Med. Sci. 70(10): 1129-1131.
108. - **Zailani S.B, Oyelese A.O, Aboderin A.O.** (2003). *Determination of baseline antibody titre to S. typhi/paratyphi in Ile-Ife, Nigeria.* Afr. J. Med. Med. Sci; 32(3):307-10.