



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO COMO MÉTODO
DE DETECCIÓN DE *Trichinella spiralis* EN SALCHICHA Y
JAMÓN DERIVADOS DE CERDOS INFECTADOS
EXPERIMENTALMENTE”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTAN:

ANA BERENICE LÓPEZ LUGO

ALEJANDRO PABLO SÁNCHEZ PAREDES

ASESOR: M en C JUAN PABLO MARTÍNEZ LABAT

COASESOR: D en IM JORGE LUIS DE LA ROSA ARANA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016



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.
 FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES CUAUTITLÁN
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán.

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

La espectroscopia de infrarrojo como método de detección de Trichinella spiralis en salchicha y jamón derivados de cerdos infectados experimentalmente.

Que presenta la pasante: ANA BERENICE LÓPEZ LUGO
 Con número de cuenta: 30102446-0 para obtener el Título de: Médica Veterinaria Zootecnista

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 19 de septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Dora Luz Pantoja Carrillo	
SECRETARIO	Dra. Esperanza García López	
1er SUPLENTE	M en C. Salvador Carlos Flores Peinado	
2do SUPLENTE	M.V.Z Norma Micaela Villamil González	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
 En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
 (Art 127 REP)
 HHA/Vc



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

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

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

ATN: M. en A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.
EXÁMENES PROFESIONALES

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

La espectroscopia de infrarrojo como método de detección de Trichinella spiralis en salchicha y jamón derivados de cerdos infectados experimentalmente.

Que presenta el pasante: ALEJANDRO PABLO SÁNCHEZ PAREDES
Con número de cuenta: 09728347-4 para obtener el Título de: Médico Veterinario Zootecnista

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 19 de septiembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M.V.Z. Dora Luz Pantoja Carrillo	
SECRETARIO	Dra. Esperanza García López	
1er SUPLENTE	M. en C. Salvador Carlos Flores Peinado	
2do SUPLENTE	M.V.Z. Norma Micaela Villamil González	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.
(Art 127 REP)

HHA/Vc

Agradecimientos:

Al M. en C. Juan Pablo Martínez Labat por brindarnos la oportunidad de participar en este gran proyecto. Así como por su convicción y radiante entusiasmo hacia la parasitología. Y sobre todo por su calidez humana. Gracias Dr. Pablo

Al Dr. Jorge Luis de la Rosa por recibirnos afablemente a ser parte de su equipo de trabajo durante la realización de este proyecto. Por su pasión a su vocación, su apoyo incondicional y la experiencias conseguidas a través de éste. Gracias Jorge.

Al M. en C. Fabián Gómez de Anda, por compartir su proyecto con nosotros.

Al MVZ Arturo Sandoval, por la enseñanza práctica, su tiempo y dedicación en una fase clave del desarrollo experimental.

Al M. en C. Salvador Flores Peinado y al MVZ Andrés Cardona Leija quienes nos permitieron el uso de las instalaciones del Taller de cárnicos y rastro. Agradecemos su disposición, paciencia y conocimientos transmitidos en cada etapa del proceso.

A la Ingeniera en Alimentos Alicia Pérez Morales y a la MVZ Maribel Domínguez por abrirnos las puertas al uso de las instalaciones del Taller de Alimentos. Así mismo, a las personas que integraron el equipo de trabajo por sus aportaciones, apoyo y tiempo dedicado.

Al Sr. Leonel Jacob de la Cruz operador y encargado del área de incineración quien nos brindó su ayuda y disposición constante.

A la Estudiante de Especialidad en Medicina de perros y gatos. Diplomada y MVZ María Fernanda Ramírez González y al Psicólogo Educativo. Especialidad en Entornos Visuales de Aprendizaje. Consultor educativo y empresario José Luis Jiménez García por su apoyo desinteresado, ya que sin su impulso, asesoría y determinación no habríamos logrado concluir este gran proyecto de vida.

Gracias a Jaime Mussa, Noemi Belén, Carmelita, Tere, compañeros del Laboratorio de Helmintos Tisulares en el InDre, siempre dispuestos a colaborar con sus conocimientos y experiencias.

A las Instituciones:

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, con nombramiento especial a los laboratorios de Parasitología, Anatomía y Virología.

Instituto de Referencia Epidemiológica InDre.

Al Laboratorio de Biofísica, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

Un agradecimiento a los animales de laboratorio, sin los cuales no podrían ser realizados estos proyectos de investigación.

Especialmente agradecemos a los seis animales únicos de quienes obtuvimos un aprendizaje personal y profesional.

Agradecimientos:

Al Maestro Constructor.

A mis padres: María Dolores y Pablo que han dedicado su tiempo y vida para que sus hijos seamos y hagamos lo mejor, quienes me enseñaron con ejemplos puestos en práctica, sobre el amor, responsabilidad, honestidad y honradez, valores que hacen de cada pequeño el hombre que será en el futuro.

Maribel, hermana que jugo conmigo de niños, que compartió el gozo de ser adolescentes, mujer que me ha brindado apoyo en cada momento que lo necesite durante todo este tiempo.

Gracias:

MVZ EPC Gishé Tiyi Martínez Rodríguez, MVZ Rubén Granada Tovar por las enseñanzas, profesionales y personales, dándome la confianza para el ejercicio diario de la práctica.

Agradezco a familiares, amigos y profesores que me dieron apoyo

Ojalá todo hombre tenga la dicha de encontrar esa voz que nunca te deja caer, ese hombro que nunca parece cansarse, y esa mano que sabe cuando ser firme para guiar y cuando ser suave para acariciar, para así aprender como yo, que no hay mitades que solo se es dos caminando y viendo hacia el mismo horizonte al mismo latido

Gracias Ana Berenice

Gracias:

A mi Madre Martha porque a pesar de todo obstáculo, permanece constante. Regalándonos en cada acción cotidiana una muestra de afecto y sobre todo por ser parte esencial de este logro.

A mi Padre Juan, por su determinación, y el apoyo firme para culminar esta etapa de mi formación profesional.

A mi hermano Víctor por ser un regalo de compañía en la infancia, por su dedicación y presencia en mi vida.

Al Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate, al MVZ M. en C. Osvaldo López Díaz, al MV Juan Carlos Pinto, por su valiosa influencia en mi trayecto profesional y personal.

Gracias a profesores, amigos y compañeros que me brindaron invaluable enseñanzas y experiencias.

Un agradecimiento de sumo amor dirigido a la persona que ha fungido como pareja, amigo y compañero incondicional. Presente en todo momento de ésta, nuestra trayectoria. Lo hemos logrado Alex!!

Los premios de la vida se encuentran al final de cada jornada, y no me corresponde a mí saber cuántos pasos son necesarios a fin de alcanzar mi meta. Persistiré, persistiré y persistiré de nuevo. Cada obstáculo que se me presente, lo consideraré como un mero rodeo en el camino que me lleva a la meta.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	I
ABREVIATURAS USADAS	III
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Generalidades	3
2.2 Clasificación taxonómica de <i>Trichinella spiralis</i>	5
2.3 Epidemiología	7
2.4 Triquinelosis humana	10
2.5 Triquinelosis en cerdos	11
2.6 El papel de las ratas	12
2.7 Morfología de <i>Trichinella spiralis</i>	12
2.8 Ciclo Biológico	16
2.9 Patogenia y sintomatología en humanos	20
2.10 Signos clínicos en cerdos	21
2.11 Lesiones	22
2.12 Respuesta inmune en el hospedador.....	22
2.13 Antígenos de <i>Trichinella spiralis</i>	26
2.14 Diagnóstico	28
2.14.1 Métodos directos	29
2.14.2 Métodos indirectos.....	30
2.15 Prevención y control	33
2.16 Tratamiento.....	35
2.17 Normas de Regulación.....	36
2.18 Derivados cárnicos	37
2.18.1 Jamón.....	39
2.18.2 Salchicha	39
2.19 Espectroscopia de Infrarrojo	40
2.19.1 Regiones Espectrales	43

2.19.2 Espectroscopía de Infrarrojo Medio por Transformada de Fourier (MID-FTIR)	44
2.19.3 Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR)	46
3. JUSTIFICACIÓN	48
4. OBJETIVOS	50
5. MÉTODO EXPERIMENTAL	51
6. MATERIALES Y MÉTODOS	52
7. RESULTADOS	67
8. DISCUSIÓN	89
9. CONCLUSIONES	99
10. BIBLIOGRAFÍA	100
APÉNDICE I. Soluciones	114

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

FIGURA	NOMBRE	PÁGINA
1	Distribución geográfica. Casos reportados de <i>Trichinella spiralis</i>	9
2	Distribución de casos reportados de triquinelosis en la República Mexicana	10
3	Morfología de macho y hembra adulto de <i>Trichinella spiralis</i>	14
4	Morfología de la Larva muscular (LM) de <i>Trichinella spiralis</i>	16
5	Larva en músculo	16
6	Ciclo biológico de <i>T. spiralis</i>	18
7	Fases del ciclo de <i>T. spiralis</i>	19
8	Mecanismos de expulsión de los nemátodos del intestino	24
9	Tipos de vibraciones moleculares	42
10	Espectro de infrarrojo medio correspondiente al isopentano.	44
11	Diagrama del FTIR	45
12	Sistema Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR)	46
13	Espectrofotómetro MID-FTIR equipado con HATR	46
14	Secuencia de sacrificio de los cerdos	58
15	Triquinoscopía: LM de <i>Trichinella spiralis</i> en músculo de rata	68
16	Digestión enzimática	69
17	Determinación por ELISA de la evolución de las concentraciones de anticuerpos en sueros de cerdos infectados con diferentes cargas parasitarias	71
18	Carga parasitaria cuantificada en diferentes regiones anatómicas de cerdos infectados experimentalmente	73
19	Producto terminado, empacado al vacío	75
20	Espectros de las larvas de <i>Trichinella spiralis</i> detectadas por espectrofotometría.	76
21	FTIR-HATR espectros de los diferentes músculos de cerdos infectados y no infectados con <i>Trichinella spiralis</i>	78-81
22	FTIR-HATR espectro de jamón de cerdos infectados y no infectado con <i>T. spiralis</i>	83
23	FTIR-HATR espectro de salchicha de cerdos infectados y no infectado con <i>T. spiralis</i> .	84
24	LM de <i>Trichinella spiralis</i> en corte de jamón	86
25	LM de <i>Trichinella spiralis</i> en corte de salchicha	86
26	Número de larvas cuantificadas en salchicha y jamón	87

CUADRO	NOMBRE	PÁGINA
1	Características de especies y genotipos del género <i>Trichinella</i>	6
2	Clasificación de productos cárnicos	38
3	Clasificación de salchichas	40
4	Ingredientes empleados en la elaboración de jamón	59
5	Ingredientes empleados en la elaboración de salchicha	61
6	Tren de tinción con hemalumbre de Mayer	66
7	Gramos de salchicha y jamón administrado a cada ratón.	67
8	Carga parasitaria en ratas	70

ABREVIATURAS USADAS

ABS	Albumina Sérica Bovina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIOH	Hidróxido de Aluminio
ATM	Refractancia Total Atenuada
cm	Centímetro
dpi	Días Post Infección
ELISA	Del inglés Enzyme Linked immunosorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
E-S	Excreción-Secreción
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FCA	Adyuvante Completo de Freud
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
FIA	Adyuvante Incompleto de Freud
FT	Transformada de Fourier
°C	Grados Centígrados
G	Gauge (calibre)
g	Gramos
HATR	Refractancia Total Atenuada Horizontal
HMC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
hpi	Horas Post Infección
InDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IFN- γ	Interferón Gamma
IAM	Inspección <i>Antemortem</i>
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IPM	Inspección <i>Postmortem</i>
IRM	Infrarrojo Medio
IR	Infrarrojo

KDa	Kilo Daltones
kg	Kilogramos
kGy	Kilogray
LM	Larva Muscular
LRN	Larva Recién Nacida
L1	Larva 1
M	Molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
nm	Nanómetros
NMX	Norma Mexicana
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMC	Organización Mundial de Comercio
OMS	Organización Mundial de la Salud
O/W	Aceite/Agua
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfato Salino
PBS-T	Solución Amortiguadora de Fosfato Salino Adicionado con Tween
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PES	Producto Excreción Secreción
pH	Potencial de Hidrógeno
pi	Post Infección
PM	Peso Molecular
ppm	Partes por Millón
PV	Peso Vivo
rpm	Revoluciones por Minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SECOFI	Secretaría de Comercio y Fomento Industrial
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
TCD4+	Linfocito Cooperador
TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante Beta
Th	Linfocito T helper o cooperador

TIF	Tipo Inspección Federal
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TSL-1	Larva 1 <i>Trichinella spiralis</i>
WB	Western Blot
µm	Micrómetro

1. RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo con el propósito de determinar la capacidad de la espectroscopia de infrarrojo por la transformada de Fourier (FTIR), con refractancia total atenuada horizontal (HART) para identificar la presencia de la larva muscular (LM) de *Trichinella spiralis* en salchicha y jamón derivados cárnicos preparados a partir de carne de cerdos con infección inducida.

En este trabajo, se emplearon seis cerdos York Shire-Landrace de cuatro semanas de edad, cinco de ellos fueron infectados vía oral con la LM a diferentes concentraciones: 13,000; 6500; 3500; 1625; 812 larvas/cerdo, conservando un animal sin infectar como testigo negativo. Después de 24 semanas de infección, los cerdos fueron sacrificados y se obtuvieron las siguientes piezas cárnicas: brazuelo, pierna, espaldilla y costillar, las cuales se tomaron para la elaboración de salchicha y jamón. Los espectros se escanearon sobre un rango de número de onda de 4000-650 cm^{-1} con un promedio de 64 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros obtenidos determinaron la presencia de *Trichinella spiralis* en el rango FTIR de 1700-900 cm^{-1} lográndose la discriminación entre producto infectado y no infectado. Los resultados obtenidos indican que el uso de este procedimiento con un buen potencial para detectar de manera rápida y confiable la presencia del nematodo, planteándose su posible aplicación en otros derivados cárnicos con el mismo propósito.

Aprovechando el material obtenido simultáneamente se emplearon porciones comprimidas entre portaobjetos de salchicha y jamón que se sometieron a la tinción de hemalumbre de Meyer para cuantificar las LM de *Trichinella spiralis*. Partiendo de la cuantificación de LM se infectaron 36 ratones cepa CD1, dividiéndolos en grupos que correspondieran a cada cerdo y derivado ingerido. Cuatro semanas después los ratones inoculados fueron eutanasiados sometiéndose sus tejidos musculares a triquinoscopia y digestión enzimática en

los que no se detectó la presencia de larvas, demostrando que el proceso al que fue sometida la carne inactivó a las fases infectantes.

La técnica de espectroscopia de infrarrojo entonces debe ser considerada como una herramienta eficaz para detectar con precisión estos organismos parasitarios, pudiendo emplearse tanto en la carne recién obtenida hasta en los subproductos cárnicos ya terminados. Con esto entonces se tiene la posibilidad de determinar este tipo de contaminantes en todas las etapas del manejo de la carne y sus derivados para reducir el riesgo de contraer zoonosis para el humano. Por tanto, es de importancia el considerar su aplicación inmediata en establecimientos dedicados a estos aspectos, en favor de la salud pública y veterinaria.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades

El término helminto, del griego ελμινθ significa gusano y originalmente se usó para denominar a los gusanos intestinales pero en sentido más amplio suele incluir las especies parasitarias y de vida libre, gusanos cilíndricos (*phylum Nematoda*), gusanos gordiáceos (*phylum Nematomorpha*), los turbelarios, tremátodos y cestodeos (*phylum Platyhelminthes*) y los acantocéfalos (*phylum Acanthocephala*). En una acepción más amplia aún, comprende también a los hirudíneos que incluyen a las sanguijuelas, una clase del *phylum Annelida*. Todas estas especies pertenecen al subreino *Metazoa* (Chester *et al.*, 1986).

Los nematodos o gusanos cilíndricos, están entre los animales más numerosos de la tierra, existiendo aproximadamente 10,000 especies repartidas en muy diversos hábitats. Hay tres tipos básicos de nematodos, los que residen en agua dulce, en el mar y en suelo; los que parasitan a las plantas, y los que parasitan a los animales domésticos, silvestres y en algunos casos a los seres humanos.

Eventualmente algunos de los nematodos que afectan a los animales tienen el potencial para infectar a los humanos provocando entonces problemas zoonóticos. Las zoonosis parasitarias representan un problema médico especial dado que no son tomadas como una primera opción en medicina humana para considerarlas dentro de los esquemas de diagnóstico regulares, entre estas infecciones se sitúan las más extendidas y graves en el ser humano. Casi todas las zoonosis parasitarias son desde el punto patobiológico, complejas en cuanto a sus relaciones inmunológicas y fisiológicas con sus hospedadores y son epidemiológicamente complejas en lo que se refiere a sus ciclos de transmisión.

La mayoría de las especies de parásitos de los animales que producen infecciones en el hombre son comunes a otros vertebrados y se clasifican, en consecuencia, como agentes de zoonosis (OMS, 1979). Dentro de la clasificación de los parásitos que afectan a los cerdos ocupa un lugar importante el nematodo

Trichinella spiralis, agente etiológico de una de las zoonosis parasitarias más importantes (Vega, 1991).

La triquinelosis es causada por el género *Trichinella* que resulta importante debido a la gran cantidad de hospedadores mamíferos a los que afecta, a su distribución mundial, a su trascendencia en salud pública, se estima que 11 millones de personas a nivel mundial están parasitadas (Quiroz y Froylan, 2006), pero también por representar un problema económico en producción porcina e inocuidad alimentaria (Gottstein *et al.*, 2009). El ciclo de vida de *Trichinella* es muy semejante en todos los mamíferos afectados, el aspecto más importante es su transmisión obligatoria por medio del consumo de carne (Quiroz y Froylan, 2006). La principal fuente de infección humana en todo el mundo es el cerdo doméstico, sin embargo, la carne de caballo y jabalí han jugado un papel importante durante los brotes de las últimas tres décadas (Gottstein *et al.*, 2009).

En el año de 1822, Tiedman observó por primera vez la larva de *Trichinella spiralis*, encapsulada en carne de cerdo. Poco después, Peacock en 1828, la describió en Inglaterra (Tay *et al.*, 2002). En 1835 Paget y Owen identificaron la larva infectiva a partir de muestras de tejido muscular de un cadáver humano. Posteriormente, en 1850, Herbist logró exitosamente la transmisión del helminto a tres cachorros de perro a los que alimentó con carne de un tejón infectada con la larva del parásito. Asimismo, en 1857 Leuckart y en 1859 Virchow infectaron con éxito a ratones de laboratorio y a un perro, respectivamente, pero ambos autores se demoraron en sus conclusiones debido a la confusión de la época entre *Trichina* (género con el que se había designado a *Trichinella*) y *Trichuris*. En 1860 Zenker envió a Leuckart y Virchow una muestra de tejido muscular de una mujer que había muerto de triquinelosis; éstos infectaron con éxito un conejo, un perro y un cerdo; aunque Leuckart había dirigido su investigación a los perros, finalmente, estos autores alemanes describieron el ciclo completo de *Trichinella spiralis* (Quiroz y Froylan, 2006). Railliet en 1895 sugirió cambiar el nombre del género *Trichina* a *Trichinella*, en razón de que el primero ya había sido dado a otro organismo (Ramírez, 1981).

2.2 Clasificación taxonómica de *Trichinella spiralis*

La clasificación taxonómica del género *Trichinella*, se establece de la siguiente manera (Ramírez, 1981; Flisser y Perez, 2006; Quiroz y Froylan, 2006; Caracostantogolo, 2009):

Reino	<i>Animalia</i>
Subreino	<i>Metazoa</i>
Phylum	<i>Nematoda</i>
Clase	<i>Enoplea</i> (sinonimia <i>Adenophorea</i> , <i>Aphasmeida</i>)
Orden	<i>Trichocephalida</i>
Superfamilia	<i>Trichinoloidea</i>
Familia	<i>Trichinellidae</i>
Género	<i>Trichinella</i>

Actualmente, se reconocen ocho especies y cuatro genotipos en el género *Trichinella* (Cuadro1), clasificación que fue propuesta en base a la capacidad de inducir la formación de una cápsula de colágeno fuera de la célula muscular parasitada, (Pozio y Zarlenga, 2005), a los criterios de infectividad, distribución geográfica e isoenzimáticas de este nematodo (Wakelin y Goyal, 1996).

Trichinella spiralis, muestra una distribución cosmopolita en zonas climáticas templadas y ecuatoriales, ya que ha sido pasivamente importada a la mayoría de los continentes debido a su alta infectividad en cerdos y ratas sinantrópicas. Asimismo, es el agente etiológico de la mayoría de las infecciones humanas y muertes en todo el mundo, su patogenicidad es mayor que la de las otras especies debido al mayor número de larvas recién nacidas producidas por las hembras y de la reacción inmune más fuerte inducida en los seres humanos en relación con los otros genotipos (Pozio y Zarlenga, 2005).

Cuadro1. Características de especies y genotipos del género *Trichinella*

Especie o genotipo de <i>Trichinella</i>	Cápsula de colágeno	Hospedadores	Principal fuente de infección en humanos	Tolerancia a la congelación
<i>T. spiralis</i> (T1)	Si	Mamíferos domésticos y silvestres	Cerdos domésticos y silvestres, caballos	Baja
<i>T. nativa</i> (T2)	Si	Carnívoros silvestres	Osos, morsas	Alta
<i>T. britovi</i> (T3)	Si	Mamíferos silvestres y raramente cerdos domésticos	Jabalíes, cerdos domésticos, caballos, zorros chacales.	Moderada
<i>T. murrelli</i> (T5)	Si	Carnívoros silvestres	Osos, caballos	Moderada
<i>T. nelsoni</i> (T7)	Si	Mamíferos silvestres	Jabalíes	Sin resistencia a congelación; tolerancia al calor.
<i>T. pseudospiralis</i> (T4)	No	Mamíferos y aves silvestres, cerdos domésticos	Cerdos domésticos y silvestres.	No resistente
<i>T. papuae</i> (T10)	No	Jabalíes, cocodrilos de agua salada	Jabalíes	No resistente
<i>T. zimbabwensis</i> (T11)	No	Cocodrilos, lagartos	No documentado	No resistente
genotipo T6	Si	Carnívoros silvestres	Carnívoros	Alta
genotipo T8	Si	Carnívoros silvestres	No documentado	No resistente
genotipo T9	Si	Carnívoros silvestres	No documentado	No resistente
genotipo T12	Si	Pumas	No documentado	----- -

Fuente: Gottstein *et al.*, 2009; Kapel, 2000.

2.3 Epidemiología

La triquinelosis se transmite de un animal a otro a través de la ingestión de carne infectada con larvas encapsuladas. Hasta ciento cincuenta especies de mamíferos de las diferentes áreas del mundo han sido encontradas con la infección, de modo que la parasitosis se puede encontrar en todas latitudes. Es una enfermedad parasitaria y en estrecha relación con los hábitos culturales y alimenticios. Aunque su incidencia ha disminuido, es un problema de salud pública porque los casos pueden no ser reportados o mal diagnosticados (Taratuto y Venturiello, 1997).

En la transmisión de la triquinelosis se consideran dos ciclos epidemiológicos, el primero silvestre, el segundo doméstico o sinantrópico, ambos pueden funcionar de forma independiente o de forma interactiva. En el primero intervienen animales silvestres carnívoros entre los que se pueden citar a osos, lobos, zorros, roedores, aves depredadoras, entre otras.

El ciclo doméstico afecta en primer lugar al cerdo, el cual se infecta al ingerir carne infestada con larvas. De igual forma, puede llegar a ser doméstico mediante especies sinantrópicas que habitan cerca de los cerdos, por ejemplo ratas y mustélidos (Quiroz, 2011).

Trichinella está presente en todos los continentes excepto en la Antártida, donde ningún informe o investigación de este parásito se ha llevado a cabo hasta el momento (Figura 1) (Gottstein *et al.*, 2009). En Estados Unidos, la incidencia de la triquinelosis ha disminuido a partir de los informes nacionales iniciados en 1947, pero en 1990 hubo dos brotes. Los cuales son asociados con los inmigrantes o grupos étnicos que prefieren carne de cerdo cruda o mal cocida o sus productos, mientras que los animales silvestres también pueden actuar como portadores (Taratuto y Venturiello, 1997). En Europa, la incidencia es baja debido a la obligatoria inspección de la carne de cerdo para la detección de LM de *T. spiralis*. Durante las dos últimas décadas, los brotes estaban relacionados con la ingestión de animales silvestres y carne de caballo infectada por *T. spiralis* y otras especies (Gajadhar y Gamble, 2000). Se han reportado casos en España, de 1986 a 1990,

430 casos en 13 brotes, sobre todo debido a la ingestión de carne de jabalí y otros animales silvestres. En los países asiáticos como Tailandia, desde 1962 la enfermedad se ha intensificado casi todos los años involucrando a 5400 pacientes. China, con 58 casos en 1981 y 86 en 1983, y Japón, con 3 brotes masivos en 1974, 1980 y 1982, cuya fuente principal era carne de oso negro. En el Líbano un brote grave en 6440 individuos se produjo en 1982, Egipto sufrió dos brotes en 1975 y 1985, principalmente debido al consumo carne de cerdo, mientras que en el resto de África las principales fuentes de infección son los animales silvestres. En Argentina, existen áreas endémicas en todo el país. Los brotes ocurridos fueron causados por el consumo de carne de cerdo y sus derivados que evaden la inspección sanitaria. En el período 1986-1993, 43 brotes con un total de 699 casos se registraron oficialmente. Durante el año 1994, 386 casos fueron diagnosticados, 711 casos en 1995 y más de 460 en 1996. Chile informó de 167 casos en 1975 y 66 en 1981, más adelante, con una caída en la incidencia, mientras que en Venezuela y Uruguay, la incidencia parece ser muy baja. En 1982, se describieron brotes por primera vez en Honduras y Costa Rica; en el resto de los países de América Latina no se han reportado casos (Taratuto y Venturiello, 1997).

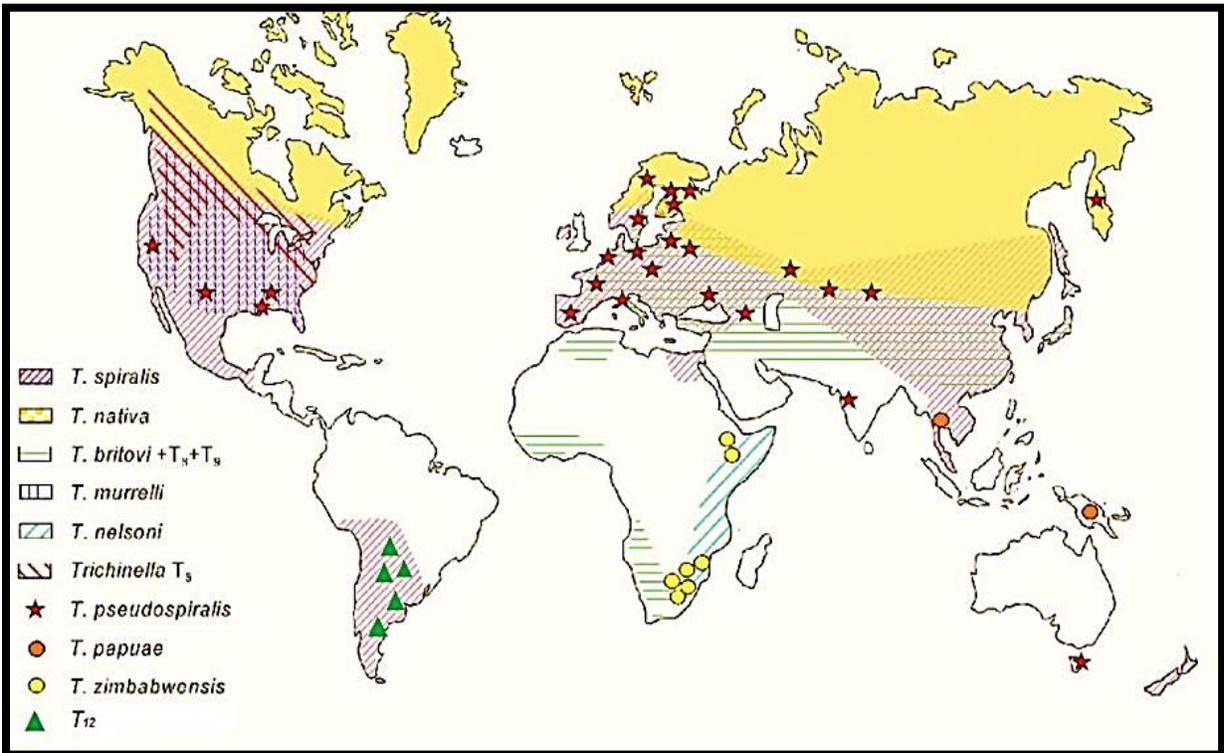


Figura 1. Distribución geográfica. Casos reportados de *Trichinella spiralis* (modificado de trichinellosis.org/Distribution_Transmiss.htm; Gottstein et al., 2009)

La triquinelosis en México, fue reportada por primera vez tanto en humanos como en cerdos durante los últimos años del siglo XIX. Los primeros sistemas de inspección de carne en los mataderos de la Ciudad de México se establecieron en 1871. Las pruebas incluyeron el examen microscópico de las muestras de animales vivos, canales y vísceras, sin embargo, no fue hasta 1891 que Zúñiga detectó *Trichinella* en cadáveres en la Facultad de Medicina en la Ciudad de México. Posteriormente, la infección por triquinelosis en humanos, cerdos, ratas, gatos y perros se han reportado en varios estados de México como Zacatecas, Michoacán, México, Durango, Jalisco, Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Colima, San Luis Potosí, Hidalgo, Chihuahua, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Sonora (Figura 2) (Ortega-Pierres et al., 2000).



Figura 2. Distribución de casos reportados de triquinellosis en la República Mexicana. Estados con alta prevalencia (■): Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México (3), Ciudad de México (4); estados con mediana prevalencia (■): Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); estados con baja prevalencia (■): Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14), Nuevo León (15); estados en donde se ha registrado la presencia de anticuerpos (■): Baja California Sur, Sinaloa, Tabasco y Chiapas; (□) Sin reporte de casos (Adaptado de Ortega y Pierres *et al.*, 2000)

2.4 Triquinellosis humana

Olvera (1896), reportó 12 casos de triquinellosis en cadáveres estudiados en el Hospital San Andrés, sugiriendo que la enfermedad no fue diagnosticada apropiadamente quizás debido al hecho de que los síntomas fueron similares a los ocurridos en las enfermedades gastrointestinales o reumáticas. El siguiente informe de triquinellosis apareció hasta 1914, cuando López-Vallejo (1916) reportó un brote mortal que se produjo en Toluca, Estado de México por consumir carne

de cerdo infectada. Los informes de 1939 a 1982 indican que la prevalencia de *Trichinella* en cadáveres examinados en México fue de 4 a 15% (Ortega-Pierres *et al.*, 2000). En el periodo de 1991-1995 sólo 282 infecciones fueron oficialmente reportadas de siete brotes presentados (Jiménez *et al.*, 2005; Murrell y Pozio, 2000).

Desde 1997 la notificación está propiamente normada, no obstante, a partir de Mayo del 2001, el registro de casos ya apareció en el boletín de Epidemiología del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaria de Salud (De la Rosa y Gómez, 2004).

Aunque la mayoría de los brotes de triquinelosis humana se asocian con el consumo de carne de cerdo mal cocida, algunos estudios han detectado su presencia en subproductos del cerdo adquiridos clandestinamente y de procedencia dudosa (Martínez *et al.*, 2000; Ortega-Pierres *et al.*, 2000). En ciudad Delicias Chihuahua se reportó una epidemia de triquinelosis que involucró a 166 personas por el consumo de chorizo mal cocido (Yépez y Ortega, 1994), así mismo en Zacatecas hay más de 100 casos reportados por la misma causa (Chávez *et al.*, 2006).

2.5 Triquinelosis en cerdos

En 1891, López y Fernández describen la presencia de *Trichinella* en cerdos importados a México desde Estados Unidos. En ese año la inspección de carne de cerdo en rastros de la ciudad de México se volvió obligatoria. Durante el período 1900-1920, cerdos infectados con *Trichinella* se suscitaron en los estados del Bajío, así como en el Estado de México, procedentes en su mayoría, del Estado de Michoacán (Ortega-Pierres *et al.*, 2000). Pero hay pocos datos sobre la incidencia en cerdos, debido al hecho de que la inspección es llevada a cabo sólo en mataderos de Tipo Inspección Federal (TIF). En estudios realizados en cerdos de traspatio pertenecientes a diferentes zonas del país reveló una seroprevalencia que van desde 1-20% (Murrell y Pozio, 2000). Como todavía ocurre en varias

localidades hoy en día, muchos de estos cerdos son de traspatio, alimentados con restos alimenticios y de roedores (Chávez et al., 2006; Murrell y Pozio, 2000; Ortega-Pierres et al., 2000). Otra forma de infección está asociada al canibalismo y la caudofagia, los cerdos tienen la costumbre de morder el rabo de sus congéneres y de esta forma ingieren parte de los músculos caudales (Euzéby, 2000; Chávez et al., 2006; Caracostantogolo, 2009).

2.6 El papel de las ratas

En el hábitat doméstico donde *Trichinella* circula entre los animales domésticos, en la rata parda (*Rattus norvegicus*) se encuentra con frecuencia la infección con *T. spiralis* (Pozio y Zarlenga, 2005). El papel epidemiológico de la rata es controversial siendo categorizada a veces como reservorio verdadero (que permite el mantenimiento de la infección en el hábitat en ausencia de la introducción del parásito por otras especies hospedadoras) o funciona principalmente como un vector a los hospedadores internos (Dupouy et al., 2007; Riva et al., 2007). Independientemente de ambas posturas, hay evidencia sustancial de que las ratas pueden jugar un papel en la transmisión de *T. spiralis* a los cerdos y debe considerarse en cualquier programa de control dentro de una granja. Tomando en cuenta que el uso de pesticidas favorece la transmisión de la parasitosis debido a que una rata envenenada se convierte en presa fácil para los cerdos y que, cerdos inadecuadamente alimentados son proclives a comer ratas. (Dupouy et al., 2007).

2.7 Morfología de *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis presenta tres fases con morfología diferenciada: Adulto (macho y hembra), larva recién nacida (LRN) y larva muscular (LM) (Cordero et al., 1999; Gállego, 2003)

- Los **gusanos adultos** poseen un cuerpo alargado y redondo, ligeramente más ancho en la región posterior (Flisser y Pérez 2006; Ramírez, 1981). El esófago consiste de una parte anterior pequeña y musculosa y una parte

posterior más grande y glandular, llamada esticosoma cuyas células poseen gránulos secretores altamente antigénicos que descargan en la luz del esófago (Alcántara *et al.*, 1992; De la Rosa y Gómez, 2004).

- El **macho**, siempre más pequeño que la hembra mide de 1.4 a 1.6mm de longitud por 40 a 60 μ m de diámetro (Cordero *et al.*, 1999; Tay *et al.*, 2002). El aparato digestivo está formado por una cavidad oral, esófago capilar, intestino medio con superficie ciliada e intestino grueso (Dupouy *et al.*, 2007) El esticosoma (45 a 55 esticocitos) ocupa las 2/3 partes anteriores del cuerpo. El testículo tiene un tramo ascendente, luego desciende y forma el conducto deferente que forma un dilatado conducto eyaculador en su parte distal, el cual desemboca en un recto cloacal desprovisto de espículas que se evagina a modo de campana copulatoria (Cordero *et al.*, 1999; Flisser y Pérez 2006; Gállego, 2003). En el extremo posterior del cuerpo hay unos pequeños apéndices cónicos a cada lado del ano que son retráctiles y cuatro papilas entre los apéndices (Figura 3) (Gállego, 2003; Quiroz, 2011).

Los machos producen espermatozoides no flagelados, de dos o tres cromosomas; las células somáticas tienen cinco cromosomas (De la Rosa y Gómez, 2004; Flisser y Pérez, 2006).

- La **hembra**, mide de 3 a 4mm de longitud por 60 μ m de diámetro; pueden diferenciarse del macho por tener el extremo posterior romo y redondeado (Figura 3) (Bowman, 2009; Gállego, 2003). El esófago, equivale al primer tercio del nemátodo. El aparato genital, está formado por un ovario el cual se sitúa en la región caudal, que produce óvulos de aproximadamente 25 μ m de diámetro, los cuales presentan sólo tres cromosomas (De la Rosa y Gómez, 2004; Flisser y Pérez 2006) seguido por un útero ocupado en su región inicial por huevos que se desarrollan a medida que avanzan por la región uterina, en donde las L1 eclosionan, por lo que la última porción del útero se encuentra repleta por larvas libres las cuales son expulsadas a

través de la vulva que se abre a la altura de la mitad del esticosoma (Cordero *et al.*, 1999; Gállego, 2003; Tay *et al.*, 2002)

- Las **larvas recién nacidas (LRN)**, están provistas de un estilete bucal además se distinguen por su largo esticosoma y por su tamaño: 100 a 120 μm de longitud por 7 a 8 μm de diámetro, a su vez poseen un conjunto de células germinales pero no órganos (De la Rosa y Gómez 2004; Dupouy *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2002). Esta fase penetra en los capilares linfáticos y portales para ser arrastrados a la circulación sistémica en busca del músculo estriado (Cordero *et al.*, 1999).

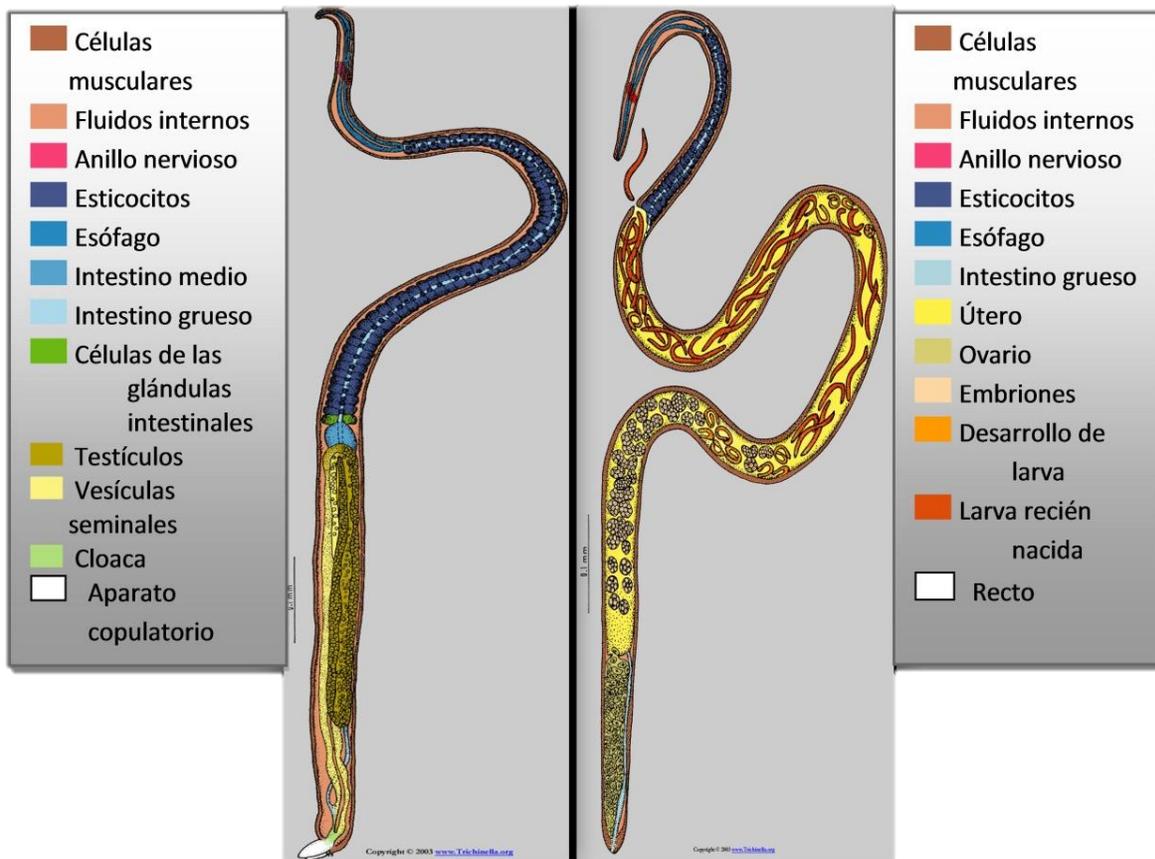


Figura 3. Morfología de macho (Izquierda) y hembra (derecha) adulto de *Trichinella spiralis* (tomado de trichinella.org/biology.htm)

- La **larva muscular (LM)**, tiene 1.2 mm de longitud por 40 μm de diámetro y se hallan enrolladas, formando dos o tres espiras, están presentes en el interior de las células o fibras de los músculos estriados esqueléticos (Figura 4 y 5) (De la Rosa y Gómez, 2004; Gállego, 2003). En esta etapa se desarrolla el esticosoma y los sexos ya se pueden diferenciar (Alcántara *et al.*, 1992).

Las larvas que llegan al músculo estriado, penetran mecánicamente a través del sarcoplasma en el sarcolema, transformando la fibra, en una macrocélula, la **célula nodriza**, con numerosos núcleos activos. Está provista de un grueso glicocálix que forma la cápsula (Cordero *et al.*, 1999; Kassai, 1998) mide de 400 a 600 μm de largo por 250 μm de ancho (Gállego, 2003; Quiroz, 2011; Tay *et al.*, 2002). La célula nodriza (Figura 5) está rodeada por una cápsula formada a su vez por dos cubiertas: la primera es una cubierta interna compuesta por glicoproteínas, proteoglicanos, lamina, fibronectina, colágeno; mientras que la segunda es una cubierta externa producida por una reacción inflamatoria: de esta manera se produce un granuloma eosinofílico (Eucéby 2000). Cada célula nodriza alberga una LM, aunque en las infecciones masivas puede encerrar a más de una LM (Ramírez *et al.*, 2007).

Después de seis a nueve meses, se desarrolla en las cápsulas un proceso de calcificación, que se inicia en los polos en forma de precipitados finos granulares y que se difunde posteriormente por toda la cápsula. Las cápsulas calcificadas de 800-1000 m^3 pueden contener larvas viables hasta por 11 años en el cerdo y hasta 40 años en el hombre (Quiroz, 2011; Markell, 1990; Ramírez, 1981).

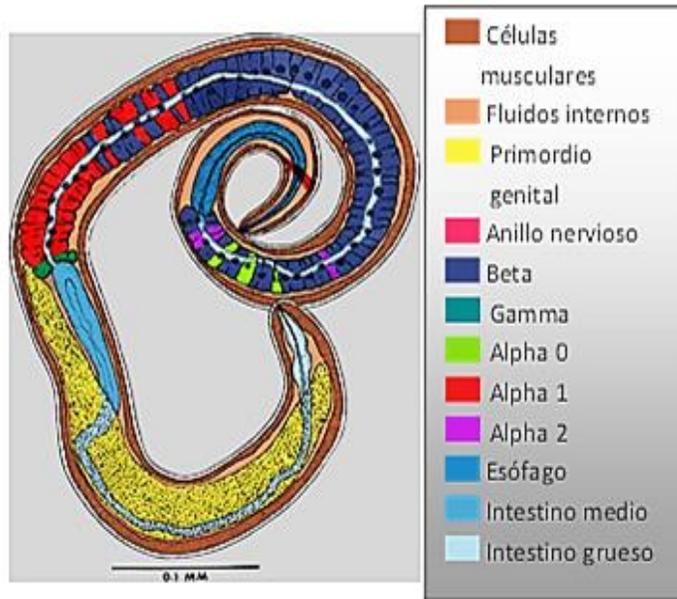


Figura 4. Morfología de LM de *Trichinella spiralis* (tomado de trichinella.org/biology.htm)



Figura 5. Enquistamiento de la larva en músculo. Las flechas indican la célula nodriza (tomado de Pereira y Pérez, 2001)

2.8 Ciclo Biológico

El ciclo de vida de *T. spiralis* (Figura 6) se completa en un sólo hospedador y tiene dos fases:

- Una **fase entérica**, que comprende cuatro estadios larvarios y los adultos (De la Rosa y Gómez, 2004). El hospedador potencial ingiere el parásito al consumir carne contaminada con la larva infectiva (L1) también llamada LM (LM; Figura 7B). El músculo esquelético se digiere y las larvas son liberadas en el estómago debido a la acción de los jugos gástricos (Wakelin y Goyal, 1996). Luego de aproximadamente 10 minutos, migran e invaden el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado por acción de las enzimas proteolíticas elaboradas por sus esticocitos (Figura 7C). Su nicho intracelular consta de una línea de aproximadamente 117 células epiteliales columnares, por lo que a esta etapa se le conoce como intramulticelular, sorprendentemente sin desintegración de las células del

hospedador (Flisser y Perez, 2006). A 30 horas posteriores a la infección (hpi), el parásito ya mudó cuatro veces, pasó de L2 a L5 hasta alcanzar la fase adulta. En el proceso se remodelaron la cutícula, las células glandulares hipodérmicas, los sistemas muscular y nervioso, aparato digestivo y esticosoma, y apareció el primordio genital. Luego de cinco días de la infección (dpi) la hembra y el macho maduros invaden el epitelio intestinal. La cópula se efectúa en ese nicho epitelial en las siguientes 40 horas; es probable que los machos se desplacen hacia la hembra, ya que *in vitro* se ha descubierto que éstas producen una feromona. Es probable que cada macho insemine a dos hembras, ya que la proporción recuperada experimentalmente es de 2.5:1. Después de la inseminación, las hembras aumentan de tamaño y penetran la mucosa intestinal, y se cree que el macho muere y es expulsado (De la Rosa y Gómez, 2004).

- **En la fase parenteral**, las hembras paren las LRN que son liberadas entre los 8 y 11 dpi (Figura 7A) y se introducen en la lámina propia del intestino y llegan a la circulación arterial a través del conducto torácico, pasan por el corazón y los pulmones hasta llegar a invadir músculo esquelético, principalmente diafragma, lengua, intercostales, bíceps y pectorales. Las LRN poseen un estilete en la parte anterior del esófago con el cual perforan el sarcolema de la fibra, penetrando en el sarcoplasma. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la penetración de las larvas se lleve a cabo por medio de procesos enzimáticos (Alcántara *et al.*, 1992; Cordero *et al.*, 1999; Flisser y Pérez 2006; Moreno *et al.*, 2009). Aquí las LRN crecen en forma exponencial (hasta 270 veces), y se diferencian poco a poco en LM. Mientras tanto, el miocito se transforma en célula nodriza en alrededor de 20 días. Esta transformación trae consigo la desaparición de las estrías musculares y la desorganización de los filamentos contráctiles así como el aumento de mitocondrias, actividad catalítica y tamaño del núcleo, el cual es desplazado hacia el centro de la célula (De la Rosa y Gómez, 2004; Euzéby 2000). El complejo célula nodriza-parásito es rodeado por una cápsula de colágeno tipo IV y VI, resultado directo de la exposición a

proteínas secretadas por el parásito. A su vez, vénulas (angiogénesis) adyacentes a la cápsula de colágeno servirán como medio de transporte a nutrientes y desechos desde la célula y hacia el interior de la misma (Despomier, 1998).

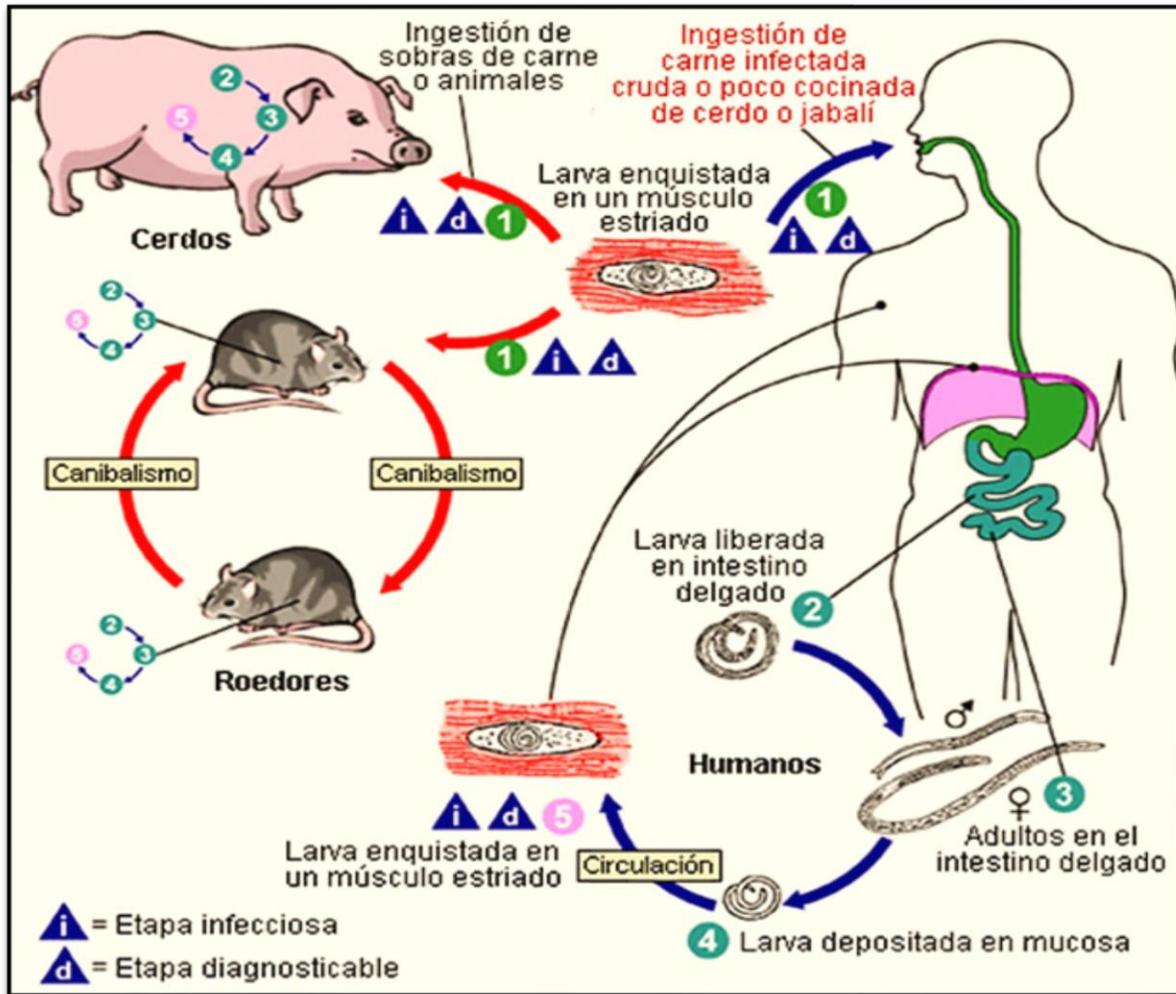


Figura 6. Ciclo biológico de *T. spiralis* (tomado de Pereira y Pérez, 2001)

El proceso de formación de la célula nodriza es desencadenado por un antígeno elaborado por los esticocitos alfa de las larvas, la glicoproteína 43kDa, que se ha detectado en el núcleo y citoplasma de la célula nodriza a partir del octavo día de la penetración y hasta seis meses después a este antígeno se le denomina TSL-1 (De la Rosa y Gómez, 2004; Euzéby 2000). En su célula nodriza, la larva experimenta varias modificaciones: aumento de volumen, engrosamiento de la cutícula, desarrollo del esófago mediante el incremento del número de esticocitos, que se diferencian en células con gránulos alfa (800 nm aspecto granuloso) en el último tercio del esticosoma y gránulos beta (600 nm, estructura homogénea) en los dos tercios anteriores y el paso de una forma lineal rectilínea a una forma inicialmente incurvada y posteriormente espiral; el complejo larva enquistada-célula nodriza puede permanecer estable durante toda la vida del hospedador o calcificarse (Euzéby 2000); es la razón por la que éste parásito es considerado como uno de los más exitosos simbiosis intracelulares que se conocen. Los cambios le permiten perdurar viable en un microambiente que él mismo ha modificado, sin provocar la muerte de la célula hospedera. Esto, sumado a la posibilidad de sobrevivir en anaerobiosis una vez producida la muerte del animal parasitado, asegura que la larva permanezca infectiva en la carroña durante varias semanas, a pesar de la putrefacción, manteniendo la enfermedad dondequiera que haya animales omnívoros de la fauna silvestre o animales domésticos (Caracostantogolo, 2009).



Figura 7. Fases del ciclo de *T. spiralis* A. Gusanos adultos y LRN (tomado de www.trichinella.org). B. Músculo infectado con *T. spiralis* (Imagen propia). C. Larva infectante, donde se indica: M, intestino medio; G, primordio genital; S, esticocitos (tomado de Makedonka y Douglas, 2006).

2.9 Patogenia y sintomatología en humanos

En el humano, la variabilidad y la intensidad de los síntomas de la triquinosis dependen del número de parásitos que afecten al individuo, la edad del paciente, sexo, estado nutricional, estado hormonal, estado inmunológico y tejido invadido (Bruschi y Murrell, 2002; Builes y Laverde, 2009; Chávez *et al.*, 2006). La enfermedad clínica puede variar desde una infección asintomática hasta una enfermedad fulminante y mortal (Riva *et al.*, 2007); se consideran infecciones leves aquéllas en las que existen de 1 a 50 LM por gramo de músculo; moderadas, de 50 a 100 LM, y graves, más de 100 LM (Alcántara *et al.*, 1992). En el transcurso de la parasitosis se distinguen tres etapas sucesivas:

- La **fase entérica**: Se inicia a partir de las 24 horas postinfección (hpi) y es causada por la fijación de las hembras y la penetración de la mucosa intestinal por parte de las larvas (Chávez *et al.*, 2006; Tay *et al.*, 2002), que origina una mala absorción e inflamación a nivel intestinal, alteración en la motilidad e infiltrado celular. Esta fase se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, diarrea o estreñimiento, anorexia, vómito, malestar en general y fiebre (Botero y Restrepo, 2012; Bruschi y Murrell, 2002; Kociecka, 2000).
- **Fase de migración**: Se desarrolla después de una semana y se asocia con respuestas inflamatorias y alérgicas derivadas de la circulación de las larvas. Esta invasión causa la ruptura de vasos, daña las células musculares directamente o estimula indirectamente la infiltración de células inflamatorias, principalmente eosinófilos; se caracteriza por fiebre, edema facial y periorbital, conjuntivitis, fotofobia, cefalea, erupción cutánea, disfagia, mialgias, insomnio, tos seca, trastornos dolorosos del movimiento de los músculos oculares, eosinofilia (incluso desde la fase entérica). En infecciones graves puede presentarse miocarditis, encefalitis, bronconeumonía, sepsis, insuficiencia cardiovascular, insuficiencia suprarrenal (Beck y Pantchev, 2010; Botero y Restrepo, 2012; Bruschi y

Murrell, 2002; Builes y Laverde, 2009; Capó y Despomier 1996; Tay *et al.*, 2002).

- **Fase de encapsulación:** Las larvas ya se han establecido en el músculo esquelético, luego de cuatro semanas post infección. El síntoma predominante es dolor muscular que se exagera con el ejercicio, no sólo a causa de una miopatía que involucra la degeneración de las células musculares afectadas por el infiltrado celular del proceso inflamatorio durante la transformación a célula nodriza sino también por la presencia de complejos inmunes en suero y líquido sinovial que contribuyen a un daño articular e inflamación periarticular. Se presenta fiebre intermitente y malestar general (Ashour y Elbakary, 2011; Bruschi y Chiumiento, 2011; Pereira y Pérez, 2001). La carga parasitaria se encuentra asociada a la severidad del cuadro clínico.

2.10 Signos clínicos en cerdos

La triquinelosis en los animales es subclínica. Excepto en los animales inmunodeprimidos infectados masivamente que pueden desarrollar fiebre, edema periorbitario, disnea, menor conversión y reducción en la ganancia de peso en un 20 al 40% (Builes y Laverde, 2009; Cordero *et al.*, 1999). En la fase intestinal, se produce una enteritis con posibilidad de cólicos y diarrea, éstos signos son debidos al incremento de la contractibilidad del yeyuno, la destrucción de enterocitos y la atrofia de vellosidades. La fase muscular se inicia hacia el día 15 pi, cursa con miositis aguda variable, según la localización de las larvas: dificultad para la masticación, disfagia, dificultades locomotoras, prurito (músculos cutáneos). No obstante, la localización muscular de las larvas no siempre produce síntomas (Euzéby, 2000).

Ribicich *et al.* (2007) inocularon grupos de 3 cerdos con dosis infectivas de 100, 500 y 5000 LM. Solamente en 2 de 9 animales infectados se observaron signos clínicos relacionados con la enfermedad como: edema periorbitario, dificultad para caminar y problemas respiratorios. El experimento tuvo una duración de 100 días

a partir de la inoculación. A partir de los 20 dpi, la ganancia de peso en los grupos inoculados con 500 y 5000 larvas fue significativamente menor que la de los animales del grupo control no inoculado (Caracostantogolo, 2009). A mayor número de LM inoculadas los cerdos presentaron eosinofilia, normalizándose los valores, alrededor del día 42 independientemente del número de LM inoculadas (Ribicich *et al.*, 2007).

2.11 Lesiones

La fase intestinal se caracteriza por una enteritis catarral aguda, la mucosa está engrosada, edematosa, cubierta de moco, algunas veces con petequias y ulceraciones en casos graves. En cortes histológicos, se observa la fusión de enterocitos, que forman sincitios en los cuales están alojadas las hembras cuyos movimientos producen la destrucción del tejido, detectándose hiperplasia de células caliciformes, vellosidades atrofiadas y la lámina propia infiltrada de células inflamatorias que incluyeron. eosinófilos, mastocitos, macrófagos, plasmocitos (Euzéby, 2000; Quiroz, 2011).

Debido a la miositis el color del músculo puede cambiar de pálido a rojo violeta. Durante el proceso de degeneración muscular hay edema, infiltración de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos y en casos agudos miositis eosinofílica. Entre la quinta y sexta semana post infección (pi) se observan finas estrías blanquecinas y quistes a los dos o tres meses (Quiroz, 2011).

2.12 Respuesta inmune en el hospedador

Trichinella spiralis desencadena una serie de mecanismos de defensa mediados por células; este parásito posee una gran variedad de antígenos de superficie en las distintas fases de su ciclo vital (Maldonado, 2007). Los cerdos infectados con *T. spiralis* exhiben una respuesta inmune que, aunque resulta similar a la de los roedores, tiene algunas diferencias potencialmente importantes. En el cerdo la expulsión de los gusanos adultos es lenta, especialmente cuando existe un menor número de larvas infectivas en la infección primaria. La respuesta anti-LRN es un

componente importante de la respuesta inmune protectora porcina (Lunney y Murrell, 1988).

En la respuesta inmune a nivel celular, hay un incremento de IgM en las células de la mucosa intestinal al principio de la infección, que continúa con un incremento en la mucosa de IgM e IgG durante la segunda semana pi. Después hay un incremento de IgG1 en células del bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y placas de Peyer. En la segunda semana en el suero también aumentan la IgG1 y la IgM.

Hay evidencias de que la respuesta inflamatoria del intestino está asociada con una eliminación inmunológica del parásito; pueden intervenir dos mecanismos, una respuesta específica contra el parásito y otra no específica causada por alteración del medio con expulsión del parásito del sitio inflamado (Quiroz, 2011).

Numerosos estudios han demostrado que los linfocitos Th CD4⁺ regulan las respuestas inmunes por medio de la secreción de citoquinas. Así, la expulsión de éste parásito está controlada por citoquinas sintetizadas por linfocitos Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13) (Gómez, Blanco y Doménech, 2007; Miller y Horohov, 2006). Las interleucinas aceleran la respuesta inflamatoria en el intestino, reclutando células cebadas, eosinófilos y linfocitos (Castañeda, 2010), la IL-4 e IL-9 generan un infiltrado rico en mastocitos y la IL-5 de eosinófilos. La IL-4 estimula las concentraciones elevadas de IgE en suero y además estimula a las células caliciformes para producir mucus y favorecer la expulsión de los parásitos (Figura 8).

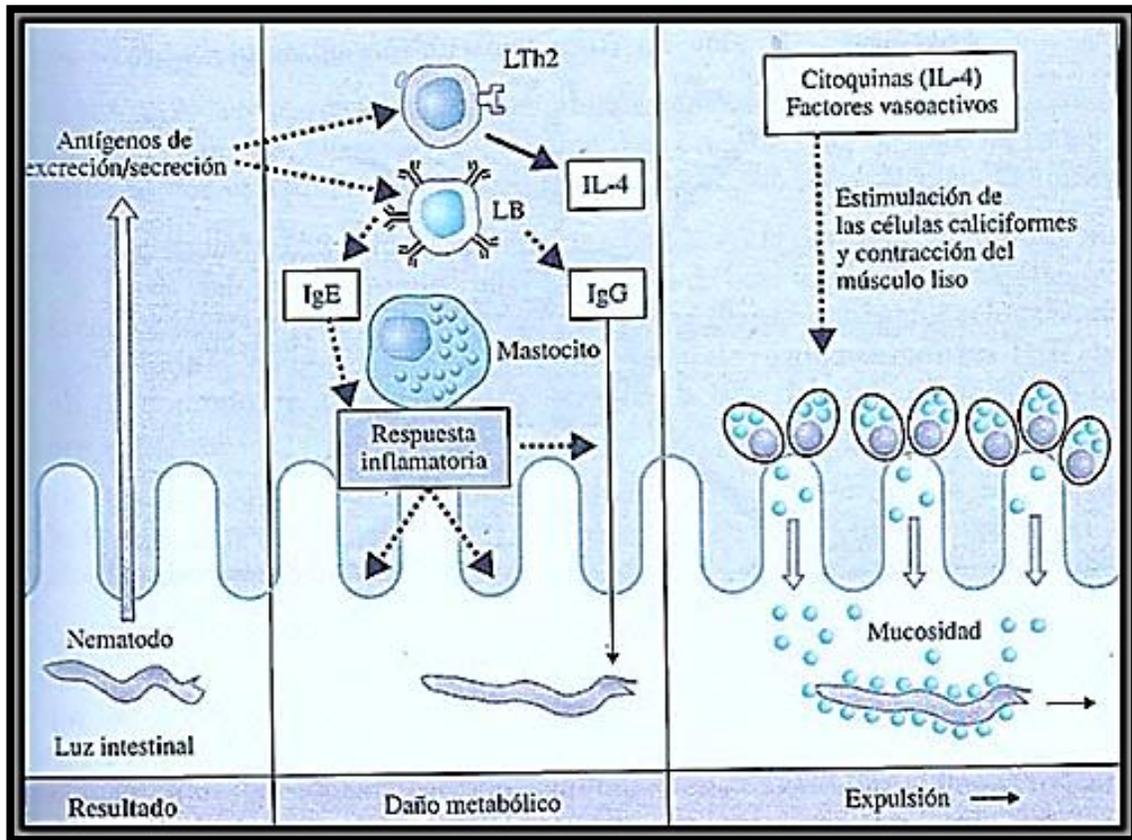


Figura 8. Mecanismos de expulsión de los nematodos del intestino. Flechas continuas, acción directa contra el parásito; flechas discontinuas, acción indirecta (tomado de Gómez *et al.*, 2007)

La combinación de los antígenos E-S con la IgE unida a los mastocitos hace que éstos últimos se degranulen y liberen moléculas vasoactivas (histamina, serotonina, leucotrieno 2), estimulando la contracción del músculo liso e incrementando la permeabilidad muscular, que ocasiona la acumulación de líquido en la luz intestinal (Castañeda, 2010; Gómez *et al.*, 2007; Picherot *et al.*, 2007).

Los niveles de $TNF-\alpha$, una citocina proinflamatoria producida por los macrófagos aumentan sólo en mucosa, a los 15 dpi, que puede estar involucrada en la inducción de una respuesta inflamatoria local y podría explicar la iniciación tardía de la expulsión de *T. spiralis* a los 21 dpi en cerdos (Picherot *et al.*, 2007).

Durante la respuesta Th2, además de la IgE, también se producen otros isotipos de anticuerpos como la IgG1 que se caracteriza por su capacidad de neutralizar las proteasas producidas por las larvas de *T. spiralis* y la IgA característica del

tejido linfoide asociado a mucosa que actúa sobre los parásitos adultos (Castañeda, 2010; Gómez *et al.*, 2007; Picherot *et al.*, 2007)

La respuesta temprana o aguda está representada por los anticuerpos de clase IgG1, y posteriormente existen los de clase IgG3 e IgG4, la última prevalece en la etapa crónica, importante en la inmunomodulación de la respuesta contra *T. spiralis*. Se sabe que la IgG reacciona contra la cavidad celómica del parásito mientras que la IgM e IgA reacciona contra la superficie del parásito (Martínez *et al.*, 2000).

En la fase de migración e infección muscular se genera una respuesta dependiente de IgG e IgE que originan un proceso de citotoxicidad activando eosinófilos y macrófagos (Castañeda, 2010).

La infección muscular provoca una respuesta de anticuerpos dirigida a los antígenos somáticos que cambia a una respuesta IgG1 dirigida a antígenos E-S. La emergencia de IgG1 coincide con la IL-10 independiente de la respuesta celular. Por lo tanto, la IL-10 limita la respuesta inflamatoria local durante la etapa temprana de la infección muscular mientras que el control de la inflamación crónica es IL-10 independiente y coincide con la aparición de una potente respuesta Th2 (Fabre *et al.*, 2009). No obstante, actualmente se sabe que el IFN- γ suprime la respuesta Th2, mientras promueve la diferenciación de Th1 y la formación de granulomas a través de la activación de los macrófagos (De la Rosa *et al.*, 2012). A su vez las células TCD4⁺ regulan los niveles de IL-10 y TGF- β el cual funge como mediador de la supresión de células T y coopera en el control de la inflamación local (Fabre *et al.*, 2009).

En cerdos con infecciones leves, se encontró que las células mononucleares CD4⁺ y CD8⁺ de sangre periférica se elevan persistentemente, incluso se incrementa el número de células que expresan el antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (HCM) clase II, lo cual indica una alteración considerable en la regulación de la respuesta inmune a este parásito. Existe resistencia a la

reinfección, la disminución de la fecundidad y el ataque hacia la LRN, mientras que la supervivencia del parásito en el intestino no se modifica (Castañeda, 2010; Gómez *et al.*, 2007; Montaña 2005).

En resumen, al parecer en cerdos y en todos los hospedadores mamíferos, la primoinfección protege a los individuos de una parasitosis masiva, ya que las larvas asociadas a la reinfección no se encapsulan y se ha observado que estas larvas son dañadas y el número de larvas encapsuladas disminuye, las reacciones inmunitarias son inducidas principalmente por los antígenos de excreción-secreción (E-S) y epítomos peptídicos de estos antígenos (Eucéby, 2000).

2.13 Antígenos de *Trichinella spiralis*

T. spiralis representa para su hospedador un mosaico antigénico muy complejo induciendo en este último respuestas tanto humorales como celulares específicas. Los antígenos de este parásito que inducen y activan estas respuestas inmunes se presentan en tres compartimientos: la superficie, los productos de excreción-secreción y el soma. Aquellos que se localizan en la superficie corporal o que son excretados por el parásito revisten la mayor importancia (Arriaga *et al.*, 1994)

La composición antigénica de este organismo posee una clasificación de acuerdo al momento en que son reconocidos por el hospedador durante el ciclo de vida de *Trichinella* y corresponden a la siguiente distribución:

- Antígenos de respuesta rápida o del grupo I, detectados desde la segunda semana pi.
- Antígenos de respuesta lenta o del grupo II, éstos son detectados a partir de la cuarta semana pi (Bolás y Del Corral, 2006; Takahashi, 1997).

El grupo de respuesta rápida (ubicados en cutícula, membranas internas, hemolinfa, saco embrionario, glándulas hipodérmicas y gránulos en el tracto reproductivo del macho) comparte antígenos de fosforilcolina (PC), un hapteno

detectado en varios nemátodos, por lo que puede dar reacciones cruzadas en pruebas inmunoenzimáticas. Los antígenos de PC se localizan tanto en LM como en el gusano adulto.

Los antígenos del grupo de respuesta lenta (presentes en el esticosoma, lumen del tracto alimentario y superficie cuticular), fueron identificados por Denkers *et al.* en 1990, presentan un rango de peso molecular de entre 43 y 68 kDa y comparten un epítipo G22.1 que contiene fucosa y tivelosa (Takahashi, 1997)

Los antígenos de superficie estudiados con técnicas de radiomarcaje por Philipp *et al.* en 1980, tienen pesos moleculares que oscilan entre los 47, 55, 90 y 105 kDa, son estadios específicos de LM y se liberan activamente en medios de cultivo por períodos limitados (Yépez *et al.*, 2007; Silberstein y Despomier, 1984). El origen de estos gránulos de superficie está en los esticocitos e incluyen los gránulos β y γ del esticosoma que es el órgano secretor de la LM. Demostrándose que los componentes de superficie/esticosoma comparten determinantes antigénicos con productos de E-S (Arriaga *et al.*, 1994; Takahashi, 1997).

Los productos E-S, son considerados antígenos de respuesta lenta y (Takahashi, 1997) son obtenidos de la primera etapa de la LM, a partir de los esticocitos. Consisten en un grupo de glicoproteínas estructuralmente relacionadas, con un peso molecular de 50-55kDa secretadas por los alfa-esticocitos, mientras que las de 48 kDa son secretadas por las células beta (Silberstein y Despomier, 1984). Los antígenos de la LM se clasifican en 8 grupos numerados de TSL-1 a TSL-8, de los cuales, los epitopos predominantes que inducen respuesta humoral son localizados en el antígeno TSL-1, que a su vez posee un epítipo glucosídico, conocido como tivelosa (Gottstein *et al.*, 2009; Euzéby, 2000). La tivelosa ha sido identificada como un carbohidrato importante y una variante de esta ha sido desarrollada para su uso en ELISA, ofreciendo ventajas por estabilidad, estandarización y especificidad. Sin embargo hay problemas de sensibilidad en algunos casos (Gottstein *et al.*, 2009).

Los antígenos somáticos, corresponden a grupos antigénicos de Peso Molecular (PM) 38 a 104 KDa son reconocidos por anticuerpos; obtenidos por sonicación de la LM, aislados por digestión péptica de ratas, ratones, conejos y cerdos parasitados; los cuales presentan reacciones cruzadas entre *Trichinella spiralis* y *Trichinella nativa* (Euzéby, 2000). Estos antígenos pertenecen al grupo de respuesta rápida (Takahashi, 1997).

2.14 Diagnóstico

Existen métodos de diagnóstico directos e indirectos. Los resultados positivos de los primeros dependen del hallazgo de las LM y su identificación por caracteres morfológicos en el tejido muscular o alimentos preparados a partir del mismo; en tanto que los métodos indirectos, sugieren la presencia de esas larvas en el hospedador a través de la detección de anticuerpos específicos mediante técnicas de serología (Caracostantogolo, 2009).

La identificación de larvas de *Trichinella* en muestras de músculo de cerdos y otras especies animales destinadas al consumo humano (por ejemplo, caballos, jabalíes y osos) se limita a la inspección *post-mortem* de las canales. La detección directa, también se aplica en el control de fauna, donde es indicador para evaluar la prevalencia de la infección por *Trichinella* entre los animales silvestres y el riesgo de interacción con los animales domésticos. El método para detectar a las LM en muestras de músculo necesita ser muy sensible y el rendimiento está fuertemente influenciado por el tamaño de la muestra, el tipo de músculo seleccionado para el muestreo y el método específico utilizado (Gottstein et al., 2009).

2.14.1 Métodos directos

Las técnicas empleadas son las siguientes:

- **Técnica de compresión o triquinoscopia**

El procedimiento consiste en la inspección óptica de muestras de tejido muscular (preferentemente diafragma) que se cortan en pequeños trozos en la dirección de las fibras y se colocan entre dos vidrios gruesos que se comprimen desde los extremos mediante dos tornillos con tuerca de mariposa, hasta quedar transparente. El compresor se coloca en un microscopio de proyección denominado triquinoscopio o en un microscopio convencional con aumento de 10 y 40x y se recorre cada porción de muestra comprimida en busca de las LM. En un mínimo de un gramo de carne que debe ser examinado para permitir una sensibilidad teórica de una larva por gramo, (un número frecuentemente citado como el umbral de la infección que presenta riesgo para la salud pública) (OIE, 2004). Dentro de las desventajas de esta técnica se encuentran: baja sensibilidad, el nivel de infección mínimo detectable es de 3 LM por gramo de tejido analizado. Se necesita mayor tiempo para inspeccionar un número importante de muestras. Pueden obtenerse resultados falsos negativos debido a la distribución de las LM (Gajadhar, *et al.*, 2009; Caracostantogolo, 2009).

- **Técnica de digestión artificial o enzimática**

La digestión enzimática es un método que trata de reproducir *in vitro* la digestión estomacal, con el objeto de aislar, visualizar y cuantificar las LM en porciones de músculos y derivados elaborados con carne de animales susceptibles a padecer la enfermedad.

Las muestras, previamente molidas de tejido obtenidas de los sitios de predilección del parásito (diafragma, maseteros, lengua) son expuestas a jugo gástrico artificial compuesto por ácido clorhídrico y pepsina (ambos al 1%) en agua destilada. Las larvas, liberadas de sus cápsulas, se recuperan mediante una serie

de pasos de sedimentación, expresando el resultado como número de larvas por gramo de muestra (OIE 2004; Caracostantogolo, 2009). De acuerdo a la NOM-194-SSA1-1994, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de los animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos, se deben tomar mensualmente dos muestras por canal de equino o porcino del total de animales sacrificados, de un tamaño mínimo de 3cm², procedentes de ambos pilares del diafragma. La sensibilidad del método de digestión es de aproximadamente 3 LM por gramo. Este nivel de detección se considera eficaz para la identificación de carne de cerdo que representa un riesgo significativo de salud pública (OIE, 2004).

La técnica tiene la ventaja de ser económica pero por el tiempo de proceso no es práctica su aplicación para el diagnóstico en rastros (Medina, 2007).

2.14.2 Métodos indirectos

Los métodos de diagnóstico serológico se emplean para la inspección ante-mortem y post-mortem a partir de muestras de sangre o suero para detectar la presencia de anticuerpos anti- *Trichinella*. Y bajo ciertas condiciones pueden tener mayor sensibilidad que los métodos de detección directa (Nöckler *et al.*, 2000).

- **Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

Es una técnica capaz de detectar complejos antígeno-anticuerpo usando anticuerpos anti-inmunoglobulina porcina marcados con colorantes fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína. Estas sustancias al ser excitadas con luz de longitud de onda del rango ultravioleta 190-380 nm, emiten luz visible que se observa como fluorescente en un microscopio de fluorescencia. Es sensible y rápida, pero tiene menos especificidad que el ELISA y el Western Blot (WB) (Caracostantogolo, 2009; Gottstein *et al.*, 2009).

- **Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) indirecto**

La prueba por ELISA tiene una mayor sensibilidad que el método de digestión enzimática, en infecciones tan leves como una larva por 100g de tejido. Sin embargo, la sensibilidad puede ser menor en la infección temprana (Gajadhar *et al.*, 2009; Mitreva y Jasmer, 2006; Nöckler *et al.*, 2000). La sensibilidad y especificidad de esta técnica son en gran medida dependientes de la calidad del antígeno utilizado, del procedimiento y especie del hospedador (Gajadhar *et al.*, 2009; Moskwa *et al.*, 2009).

La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos o de anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática pudiendo ser revelada mediante la adición de un substrato específico que, en contacto con la enzima, producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica (Ruiz y Martinez, 2007).

Dentro de las desventajas de la técnica, se encuentra la aparición de falsos negativos originados por una respuesta tardía en la cinética de anticuerpos en infecciones leves, baja respuesta del hospedador o una supresión de la respuesta inmunitaria por cronicidad de la infección (Gajadhar *et al.*, 2009; Ruiz y Martinez, 2007; Riva y Steffan, 2007). Los resultados falsos positivos se relacionan con la existencia de inmunidad cruzada con anticuerpos generados contra otros nematodos. Gamble y Graham en 1984 describieron la reactividad cruzada que estos antígenos producían, señalaron reacciones cruzadas con nematodos del tubo digestivo (*Ascaris suum*, *Trichuris suis*) (Ruiz y Martinez, 2007). Múltiples estudios experimentales han evaluado la prueba de ELISA usando antígenos E-S. El rango de sensibilidad oscila entre 93.1 y 99.2%, mientras que la especificidad varía de 90.6 a 99.4% (Gottstein *et al.*, 2009; Nöckler *et al.*, 2009; Van der Leek *et al.*, 1992).

- **Inmunolectrotransferencia (Western Blot)**

Esta técnica ofrece gran especificidad y facilidad de interpretación al permitir la visualización de anticuerpos anti *T. spiralis* presentes en sueros positivos con bandas polipeptídicas específicas obtenidas por electroforesis de los antígenos E-S, sin embargo es muy costosa y laboriosa para llevar a cabo con muestras de gran tamaño (Wee *et al.*, 2001; Lamberti *et al.*, 2003; Caracostantogolo, 2009).

WB posee una especificidad del 100% y una sensibilidad del 98.1%; es la prueba apropiada en la confirmación de los resultados obtenidos por el ELISA (Nöckler *et al.*, 2009).

- **Análisis Molecular**

Dado que no existen características morfológicas específicas en las larvas, el diagnóstico molecular basado en la amplificación del ADN se utiliza para obtener su especie o genotipo. Para este propósito, la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction) se ha desarrollado para la simple e inequívoca diferenciación entre especies y genotipos de *Trichinella*. La PCR es un sensible y rápido acercamiento molecular capaz de tipificar e identificar muestras que contienen sólo una larva (Dupouy *et al.*, 2007; Gottstein *et al.*, 2009). Aunque se considera inapropiada al momento de la inspección de carne en los rastros, debido al costo y al nivel técnico especializado que demanda la realización (Tay y Velasco, 2002).

- **Histología**

El análisis histológico muscular, revela fragmentos de larvas en diversas etapas de desarrollo. La presencia de la cápsula de colágeno o lo que queda de una cápsula destruida, y el tipo y composición de los infiltrados celulares. La transformación basofílica de células musculares, representa un valioso criterio diagnóstico de la invasión por *Trichinella*, incluso, cuando no se han detectado larvas. Este método es más sensible que la triquinoscopia en la etapa temprana de la invasión del

músculo, cuando las larvas son muy pequeñas y no se pueden distinguir fácilmente de las fibras musculares (Dupouy *et al.*, 2007).

2.15 Prevención y control

Los efectos de los cambios en el entorno político y económico, con frecuencia dan como resultado el debilitamiento o pérdida de infraestructura en la salud pública, traen como consecuencia la pérdida en las técnicas y procedimientos para preservar la cría y la práctica de sacrificio seguro en los animales, programas integrales de inspección de la carne y procedimientos eficaces de procesamiento de la misma (Merrell y Pozio, 2000). Los esfuerzos para prevenir la infección por *Trichinella* en el hombre y los animales deben estar encaminados a la educación del consumidor, sobre el riesgo de ingerir carne cruda o semicruda y derivados cárnicos tanto de origen doméstico como silvestre (Urquhart *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2007).

Es necesario el control de animales susceptibles por el método de digestión artificial estandarizado al sacrificio o después de la caza. Toda carne de animales sospechosos de *Trichinella*, pero que no pueda ser aprobada por un método de laboratorio apropiado, deberá ser tratada por un procedimiento que ha demostrado inactivar las LM. Esto se aplica tanto en fuentes de carne comerciales como no comerciales. Tres métodos han demostrado inactivar las LM de forma fiable (Gottstein *et al.*, 2009).

- i) La **coCCIÓN**, para alcanzar una temperatura central de no menos de 71°C durante al menos un minuto (es decir, la carne debe cambiar de color rosa a gris, y las fibras musculares son fácilmente separadas unas de otras).
- ii) La **congelación**, los cortes o porciones de carne de hasta 15 cm de espesor deben congelarse por lo menos a -15°C, por no menos de tres semanas. Y los cortes de hasta 69 cm de espesor, por no menos de cuatro semanas. Las condiciones para la congelación se limitan sólo a carne infectada con *T. spiralis*.
- iii) La **irradiación**, a niveles probados para inactivar las larvas de *Trichinella* (0,3 kGy) puede ser un método aceptable para hacer seguro el consumo de carne,

en países donde la irradiación de alimentos está permitido. La irradiación se recomienda sólo para alimentos envasados (Bessonov *et al.*, 2000; Gottstein *et al.*, 2009; Hendrix, 2012; Kassai, 1998; Taylor *et al.*, 2007; Urqhart *et al.*, 2001).

Además el secado ha demostrado ser una medida efectiva en la eliminación de la infectividad de la LM, contrario a lo que sucede con los procesos de adobo o curado, los cuales no afectan la capacidad reproductiva de *T. spiralis* (Medina, *et al.*, 2008).

Los cerdos de traspatio poseen mayor riesgo de infección por *Trichinella*, ya que son alimentados con restos de comida que contienen carne y a su vez tienen fácil acceso a roedores y animales silvestres. Además los cerdos criados en sistema extensivo, también están en riesgo de esta zoonosis. El conocimiento sobre el ciclo de transmisión de *Trichinella*, permite a los productores diseñar sistemas de gestión para prevenir o reducir drásticamente el riesgo de exposición (Gottstein *et al.*, 2009; Dupouy, 2000).

Los puntos clave son: i) construcción de barreras arquitectónicas y ambientales efectivas, ii) adecuado almacenamiento de alimento y piensos (Gottstein *et al.*, 2009), iii) tener un control de todos los animales susceptibles (tanto domésticos como silvestres) por el método normalizado en sacrificio y después de la caza, si es que van a destinarse al consumo humano o animal (Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos), iv) mejoramiento de la condición higiénica en la granja, incluida la eliminación y disposición adecuada de los animales muertos v) adquirir lechones procedentes de granjas en condiciones de alojamiento controlado, vi) evitar la alimentación con desechos alimenticios (Colville y Berryhill, 2007; Kassai, 2008; Taylor *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2002; Urqhart *et al.*, 2001).

Los programas que permitan la certificación de los cerdos como libres, basados en buenas prácticas de producción, deben realizar las siguientes funciones:

- i) Desarrollar un sistema de documentación de buenas prácticas de producción
- ii) Expedir certificaciones y mantener registros de granjas certificadas
- iii) Realizar periódicamente auditorías *in situ* de los productores certificados para asegurar la integridad del sistema
- iv) Realizar serología periódica de los cerdos procedentes de granjas certificadas a verificar la ausencia de infección (Gottstein *et al.*, 2009; Murrell y Pozio, 2000).

2.16 Tratamiento

En medicina veterinaria, el tratamiento, al igual que en humanos, depende de la fase de desarrollo en la que se encuentre el parásito (Cordero *et al.*, 1999). Por ejemplo, contra los gusanos preadultos (3 dpi), en el caso teórico de que se tuviera que aplicar, el flubendazol (Cordero *et al.*, 1999; Kassai, 1998) en dosis de 30-125 ppm en el alimento durante 2 semanas (Kassai, 1998). Contra adultos intestinales, pirantel, 10 mg/kg/día durante 6 días o albendazol. Contra larvas encapsuladas es muy eficaz el carbamato de bencimidazol, mebendazol 200 mg/kg/día/3 días o en su forma fluorada, flubendazol, con prednisona inyectable 20/40 mg/kg/día (Cordero *et al.*, 1999).

En el hombre, tras el diagnóstico oportuno, los antihelmínticos son los fármacos principales para el tratamiento de la triquinosis, incluyendo principalmente el albendazol y mebendazol. La dosis recomendada del albendazol es 400 mg, dos veces al día por 10 a 15 días (Botero y Restrepo, 2012); el mebendazol 200 mg/4días para la fase entérica y 250-400 mg, tres veces al día durante 21días para la fase parenteral. También se recomienda administrar en forma simultánea corticosteroides (dexametasona, 0.5 mg/kg/día durante cinco días o prednisona a razón de 40 mg/día/14días). Pero se sabe ahora que la administración de corticosteroides para tratar la miositis incrementa con frecuencia la viabilidad de las hembras, por lo que la larviposición puede aumentar, originando una infección masiva por iatrogenia (De la Rosa y Gómez, 2004).

En general no se aplica tratamiento contra la triquinosis en los animales domésticos, ya que el diagnóstico se hace principalmente en las canales en mataderos y empacadoras, además, clínicamente el problema en esta especie pasa inadvertido (Quiroz, 2011; Euzéby, 2000; Urqhart *et al.*, 2001; Cordero *et al.*, 1999; Kassai, 1998).

Hay experiencias con cerdos en los que animales infectados experimentalmente se han tratado con clorhidrato de piperacina, con lo cual se elimina del 76 al 92% de los adultos, administrando 1.5 g/kg durante siete días. Se han usado Tiabendazol, Triclorfon y Ditiazanina que han resultado efectivos y reducen en 99% a las formas adultas. En ratones se ha utilizado la Metiridina por vía subcutánea en dosis de 500 mg/kg que ha permitido eliminar a los adultos (Quiroz, 2011).

Experimentalmente, la administración de albendazol (Euzéby, 2000; Urqhart *et al.*, 2001) al cerdo (10 mg/kg/día durante tres días; dos series de tratamiento con un intervalo de un mes) entraña la destrucción de las LM en dos meses: las larvas pierden su forma espiral, su cutícula se vacuoliza y los quistes se esclerosan. Los músculos de los animales tratados de esta forma no son infectantes. En los países endémicos, se ha sugerido la utilidad de administrar sistemáticamente a los cerdos pequeñas dosis de antihelmínticos mezclados en el alimento.

2.17 Normas de Regulación

Para el humano los vehículos más importantes en la transmisión de la triquinosis, son en primer lugar la carne de cerdo y sus derivados, como jamones, salchichas, chorizos, longaniza, etcétera, crudos o insuficientemente cocidos, y en segundo término las carnes de algunas especies de animales silvestres (Ramírez, 1981).

La inspección sanitaria en rastros tiene como uno de sus objetivos el evitar enfermedades en el consumo de carne contaminada. La regulación mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los

establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de los animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos, señala que la carne de cerdo deberá ser libre de *Trichinella spiralis*, no obstante, la triquinoscopia no es obligatoria (Medina *et al.*, 2007; Tay y Velasco, 2002). En nuestro país los únicos establecimientos de sacrificio que determinan la presencia de *Trichinella spiralis* son los Tipo Inspección Federal (TIF), los cuales certifican tanto la inocuidad y la buena calidad de los productos como la adecuación de las instalaciones en donde se sacrifican animales o procesan, envasan, empacan, refrigeran o industrializan bienes de origen animal y están sujetas a regulación de la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en coordinación con la Secretaría de Salud, esto como parte del Sistema Tipo Inspección Federal, que es un conjunto de normas de control de inocuidad y calidad con un elevado estándar sanitario (SENASICA-UNAM, 2012). En México la NOM-194-SSA1-2004, incluye el programa de muestreo y método de diagnóstico basado en el proceso de digestión artificial por la Secretaría de Salud. No obstante, el control definitivo de la triquinosis en el hombre depende del control de la parasitosis en los reservorios (Medina *et al.*, 2007).

El flujo comercial a nivel internacional, está regulado por la Organización Mundial de Comercio (OMC o WTO por sus siglas en Inglés). Dentro de la normatividad más importante que le compete, se encuentra la de vigilar las políticas de la Comisión del Codex Alimentarius, establecida por la FAO y la OMS que contribuye, a través de sus normas y códigos de prácticas alimentarias internacionales, a la inocuidad, la calidad y la equidad en el comercio internacional de alimentos tanto de origen vegetal como animal (Pinelli *et al.*, 2004).

2.18 Derivados cárnicos

El consumo de la carne se ha diversificado debido a la necesidad de conservarla y de dar variabilidad en cuanto a sabores y texturas. De ahí que han surgido diferentes métodos de procesar la carne (SECOFI, 2000). La clasificación de productos cárnicos, constituye el punto de partida para su normalización, que se

realiza estableciendo normas de identidad y especificaciones de calidad, y también para los procedimientos de certificación de la calidad de la producción y del sistema preventivo de control de calidad de análisis de riesgos y control de puntos críticos. No obstante, resulta complicado clasificar los productos cárnicos por su amplio surtido. Las clasificaciones de los productos cárnicos son diversas (Venegas y Valladares, 1999). En la industria mexicana de carne tenemos dos grandes ramas: carne de consumo fresco y productos procesados (Cuadro 2). En el caso de México, se ha encontrado a partir de estudios para establecer los productos de mayor demanda que las salchichas y los jamones constituyen más del 80% total de la producción (SECOFI, 2000).

Cuadro 2. Clasificación de productos cárnicos

Tipo		Clasificación
Carne Fresca	Cortes o molida Piezas de caza o pesca	
Productos procesados	Productos regionales	Carnitas, mixiotes, barbacoa, etc.
	Carnes Frías	<ul style="list-style-type: none"> • Embutidos crudos: chorizos y longanizas. • Embutidos escaldados: salchichas mortadela, salami cocido. • Embutidos cocidos: queso de puerco, pathés y morcilla o rellena. • Carnes curadas: jamón, tocino y chuleta
	Conservas	Productos que se comercializan en salmuera

Fuente: SECOFI, 2000; Apango, 2007.

En la clasificación se tienen las siguientes consideraciones:

- **Embutidos crudos:** aquellos que no son sometidos a un proceso térmico, sólo se maduran, por medio de un secado.
- **Embutidos escaldados:** carnes frescas, curadas o sin curar que se han sometido a un escalde suave (sumergiendo en agua a 75°C) o ahumado, antes de su venta, con la finalidad de disminuir la carga bacteriana.
- **Embutidos cocidos:** éstos se someten a una cocción previa al embutido y otra posterior a éste.
- **Carnes curadas:** aquellas que son sometidas a la acción de agentes de curación en seco o húmedo.

2.18.1 Jamón

Según la NMX-F-123-S-1982, Alimentos. Jamón cocido. Especificaciones. Norma Mexicana. Dirección General de Normas, es el producto alimenticio preparado con la carne de las piernas traseras de cerdos sanos, sacrificados bajo la inspección sanitaria. Las piernas deben ser recortadas en forma especial, se debe excluir la carne maltratada, además de quitar todos los huesos y dejar prácticamente libres los cartílagos, tendones, ligamentos sueltos y tejido conjuntivo. Sometida a curación y cocimiento. El producto final debe ser empacado y refrigerado (SECOFI, 2000).

2.18.2 Salchicha

Según la NMX-F-065-1984, Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas, es el producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico, elaborado con la mezcla de carne (60% mínimo) de ternera o res y cerdo y grasas de las especies antes mencionadas, adicionado con condimentos, especias y aditivos para alimentos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de Salchichas

Parámetros	Tipo Viena(mm)	Tipo Franckfurt (mm)	Tipo cocktail (mm)
Diámetro	14-26	20-23	14-26
Longitud	50-300	80-300	30-65

Fuente: NMX-F-065-1984, Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

.La industria cárnica se ha enfrentado a las malas prácticas de manufactura, deficiencias sanitarias, particularmente en las micro y pequeñas empresas, debidas al aseo inadecuado de los establecimientos, equipo, ausencia de control de fauna nociva, falta de instalaciones sanitarias para asegurar la higiene en los procesos, mala capacitación del personal e incluso prácticas de producción artesanales sin considerar normatividad sanitaria de ningún tipo (SECOFI, 2000).

Los diferentes métodos de conservación de la carne de cerdo tanto fresca como procesada, son señalados por tener un efecto sobre la viabilidad de *Trichinella*. Sin embargo, los estudios sobre el efecto de conservación de la carne en la viabilidad del parásito son escasos (Medina, 2007).

2.19 Espectroscopia de Infrarrojo

La espectroscopia de infrarrojo (IR) es el método por el cual se estudia la absorción o emisión de energía radiante originada por la interacción entre la radiación electromagnética y el material de estudio. El término espectroscopia infrarroja (IR) hace referencia a la medición de la absorción de las diferentes frecuencias de la radiación IR por parte de los alimentos u otros sólidos, líquidos y gases (Matissek et al., 1992; Nielsen, 2009). Nació en el año de 1800, cuando Herschel hizo uso de un prisma para crear un espectro a partir de una luz blanca y colocó un termómetro en un lugar justo más allá de la región roja del espectro,

observó un aumento de la temperatura. Ésta fue la primera observación de los efectos de la radiación IR. Hacia los años de 1940, la espectroscopia IR se había convertido en una importante herramienta utilizada para identificar los grupos funcionales presentes en los compuestos orgánicos. En los 70's fueron presentados en el mercado los instrumentos comerciales de reflectancia en el IR cercano (0.8-2.5 μ m), los cuales proporcionaron determinaciones cuantitativas rápidas del contenido en humedades, proteínas y grasas de los granos de cereal y de otros alimentos (Nielsen, 2009).

Hoy en día, la espectroscopia de infrarrojo está ampliamente extendida en la industria, relacionada con diferentes áreas de aplicación: agricultura, biotecnología, cosméticos, ciencias de la tierra, de la atmósfera y mineralogía, control medioambiental, alimentos y bebidas, ciencia forense, medicina y química clínica, investigación militar, industria del petróleo, industria farmacéutica, ciencia de los polímeros, ciencia de los materiales e industria textil, etc. Como puede observarse, las aplicaciones son innumerables; en la alimentación y las bebidas, las aplicaciones son bastante amplias, algunas de ellas: control de calidad y la evaluación de autenticidad de diversas bebidas alcohólicas y cervezas, (Lachenmeier, 2007), identificación y clasificación de mieles de diferentes fuentes florales (De fuentes et al., 2008; Bertenelli *et al.*, 2007), adulteración del jarabe de fresa (Holland *et al.*, 1998), medición de la cafeína de refrescos (Paradkar e Irudayarai, 2002), detección de la adulteración de carne cocinada (Al-Jowder *et al.*, 2002), monitoreo de las dinámicas poblacionales de microorganismos en muestras de productos alimenticios (Oberreuter *et al.*, 2003), determinación del contenido total de grasas *trans* de los aceites comestibles hidrogenados (Mossoba *et al.*, 1996) adulteración de pasteles, chocolate y derivados con manteca de cerdo (Che Man *et al.*, 2005; Syahariza *et al.*, 2005), control del origen geográfico y la calidad de los aceites de oliva vírgenes (Bendini *et al.*, 2007; Gurdeniz *et al.*, 2008).

La IR se basa en que las moléculas tienen la posibilidad de rotar y vibrar a distintas frecuencias (modos normales vibracionales), o sea que una molécula puede absorber radiación IR si vibra de tal manera que su distribución de carga y,

por consiguiente, su momento dipolar eléctrico se modifican en el transcurso de la vibración (Piqué y Vázquez, 2012). Aunque en una molécula poliatómica hay muchas vibraciones posibles, las vibraciones más importantes que producen un cambio en el momento dipolar son los movimientos de tensión y los de deformación o flexión (Figura 9) (Nielsen, 2009).

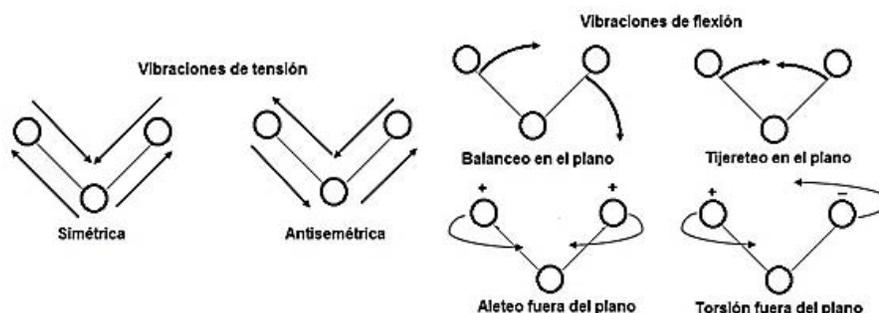


Figura 9. Tipos de vibraciones moleculares (tomado de Nielsen, 2009)

Existen modos vibracionales que inducen oscilaciones que pueden entrar en resonancia con un haz de IR. Esto produce un intercambio de energía entre el haz y las moléculas constituyentes. Existe un comportamiento característico para un enlace con un tipo atómico, un entorno químico y una concentración de enlaces determinadas. Se puede decir entonces, que en un espectro infrarrojo se pueden manifestar bandas asociadas a prácticamente todos los compuestos moleculares. Cada una de estas bandas correspondería a un movimiento de vibración de uno de los enlaces dentro de la molécula. Se sostiene entonces que el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto. Cada compuesto tendrá entonces un comportamiento particular frente a un haz de infrarrojos, en esto se basa la eficacia de la IR (Davis y Mauer, 2010; Piqué y Vázquez, 2012; Schulz *et al.*, 1993).

El espectro de infrarrojo de un compuesto es esencialmente la superposición de bandas de absorción de sus grupos funcionales específicos. Uno de los mejores aspectos es que la absorción o la no absorción, en regiones específicas de frecuencia pueden correlacionarse con movimientos específicos de estiramiento o

de flexión. Entonces, cuando se interpreta un espectro, es posible establecer que ciertos grupos funcionales se encuentran presentes en tanto que otros están ausentes (Willard *et al.*, 1991). A veces, con sólo estos datos las posibilidades de identidad pueden disminuir tanto que la comparación del espectro con una biblioteca de compuestos puros permite su identificación (Nielsen, 2009; Willard *et al.*, 1991).

2.19.1 Regiones Espectrales

La radiación infrarroja es energía electromagnética con longitudes de onda (λ) más largas que la luz visible, aunque más cortas que las microondas. De manera general, para la espectroscopía IR pueden ser utilizadas las longitudes de onda desde 0,8 hasta 100 μm y se dividen en las regiones del IR cercano (0.8-2.5 μm), IR medio (2.5-15 μm) y el IR lejano (15-100 μm) (Nielsen, 2009; Lin *et al.*, 2009).

La espectroscopía en la región del infrarrojo medio (IRM) es una de las técnicas analíticas disponibles más importantes para conseguir información sobre aspectos cualitativos y cuantitativos de analitos en tiempo real en los procesos de manufacturación (De fuentes *et al.*, 2008). Mide la capacidad de una muestra para absorber luz en la región de 2.5 - 15 μm o en número de onda entre 4000 – 667 cm^{-1} Figura 10 ; (Nielsen, 2009; www.eq.upc.edu).

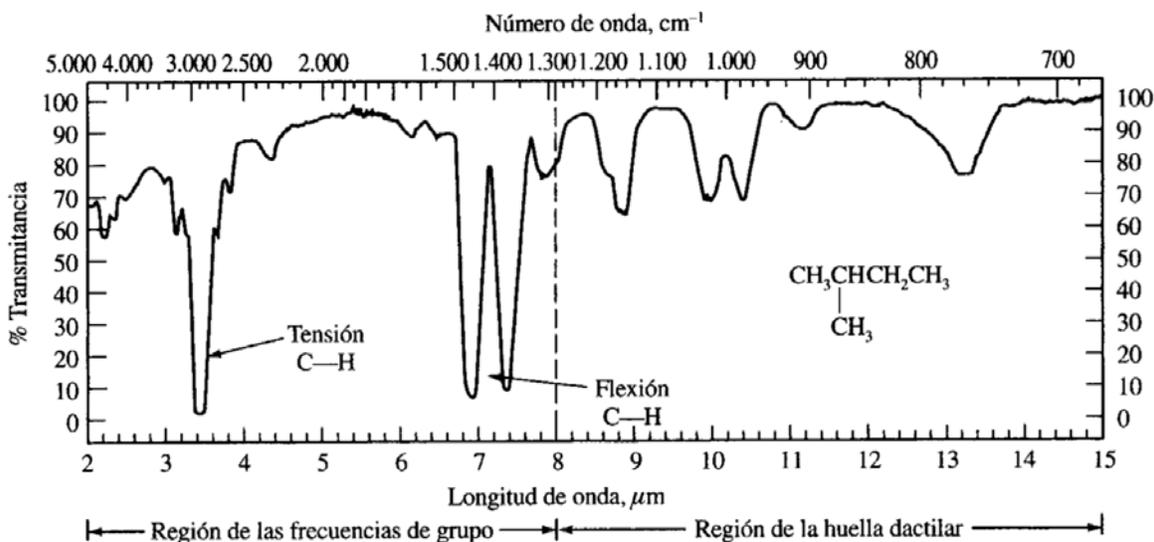


Figura 10. Espectro de infrarrojo medio correspondiente al isopentano. Absorción [% A] versus longitud de onda [cm⁻¹]. (Tomado de <http://lipas.uwasa.fi/~TAU/AUTO3220/Umea4handouts.pdf>)

2.19.2 Espectroscopía de Infrarrojo Medio por Transformada de Fourier (MID-FTIR)

Se utilizan dos tipos de espectrómetro para la espectroscopia de IR medio: los instrumentos dispersivos y los instrumentos de la transformada de Fourier (FT), éstos últimos son los más recientes. En los instrumentos de la TF, la radiación no es dispersada sino que, más bien, todas las longitudes de onda llegan al detector simultáneamente y se hace uso de un tratamiento matemático, conocido como una FT, para transformar los resultados en un espectro IR típico (Nielsen, 2009). En lugar de un monocromador, el instrumento utiliza un interferómetro de Michelson de barrido, el cual divide un haz de radiación IR y la vuelve a combinar. La radiación de la fuente de infrarrojo es colimada (alineada) por un espejo y el rayo resultante se divide en el divisor del haz; la mitad del rayo pasa al espejo fijo y la otra mitad se refleja sobre el espejo móvil. Después de reflejarse, los dos rayos se recombinan en el divisor del haz y, para una longitud de onda dada, interfieren constructiva o destructivamente dependiendo de la diferencia de las trayectorias ópticas entre los dos brazos del interferómetro. El esquema de la intensidad de

energía obtenido como una función de la diferencia en los caminos ópticos se conoce como interferograma, el cual representa la intensidad frente al camino óptico que se convierte, mediante la transformada de Fourier, en un espectro IR que presenta la absorbancia frente a la frecuencia.

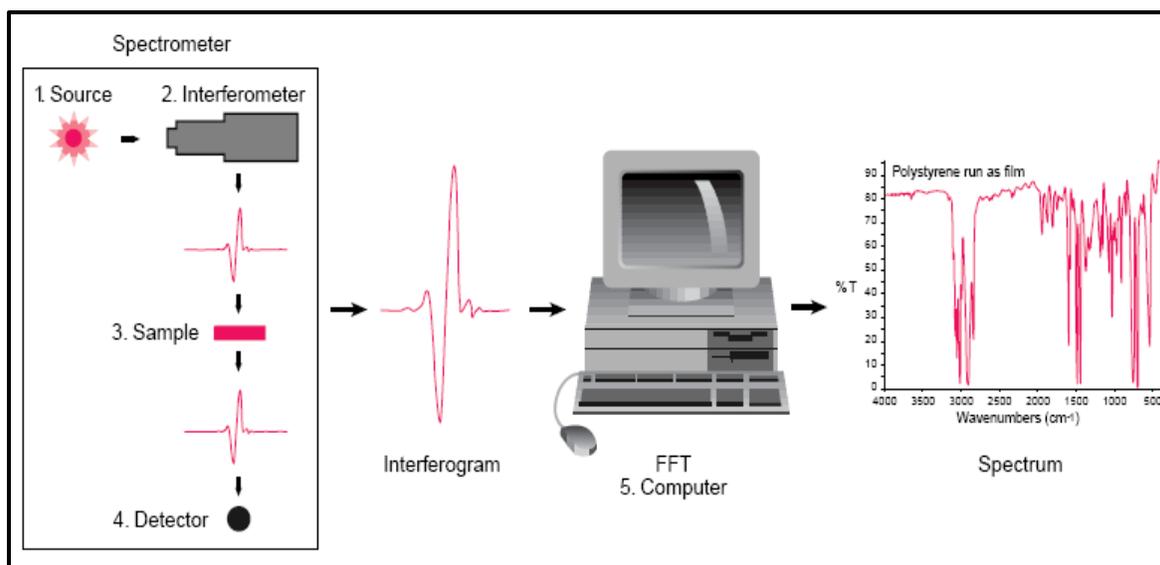


Figura 11: Diagrama de la obtención del espectro a través de la espectroscopia de infrarrojo por Transformada de Fourier (tomado de Gómez de Anda *et al.*, 2012)

Un computador permite que la transformación matemática sea completada rápidamente (Figura 11). Dado que todas las longitudes de onda son medidas a la vez, los instrumentos de la FT adquieren los espectros más rápido, lo que por acumulación de espectros permite una gran mejora en la relación señal-ruido en comparación con un espectrómetro dispersivo (Nielsen, 2009; Schulz *et al.*, 1993; Willard *et al.*, 1991).

2.19.3 Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR)

La espectroscopía de infrarrojo medio por la transformada de Fourier MID-FTIR es una técnica que se caracteriza por su capacidad analítica de obtener espectros a partir de una gama muy amplia de sólidos, líquidos y gases. Sin embargo en muchos casos la muestra requiere una preparación con el fin de obtener un espectro de buena calidad. Por ello, la técnica de la reflectancia total atenuada horizontal (HATR) ha revolucionado en los últimos años el análisis de muestras sólidas y líquidas ya que favorece en la rapidez de muestreo y reproducibilidad espectral (Perkin Elmer 2005; Karoui *et al.*, 2007).

Este accesorio, basado en la reflectancia, no guía la radiación infrarroja a través de la muestra en sí, sino a través de un cristal con alto índice de refracción que está en contacto con la muestra. Con esto, el haz se refleja varias veces dentro del cristal antes de ser dirigido hacia el detector. Cuando el rayo llega a la superficie reflectante, penetra en la muestra hasta una profundidad de aproximadamente $0,1 \lambda$, donde λ es la longitud de onda de la radiación (Figura 12 y 13) (Etzion *et al.*, 2004).

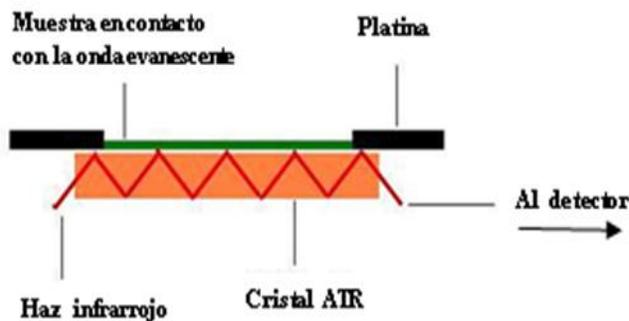


Figura 12: Sistema Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR) (tomado de Perkin Elmer 2005)



MID Figura 13: Espectrofotómetro -FTIR equipado con HATR (imagen propia)

La FTIR-HART ha demostrado ser una opción para el análisis cualitativo y cuantitativo de los alimentos. En trabajos realizados por Gómez de-Anda *et al.*, 2012 se logró identificar la presencia de *Trichinella spiralis* en el rango FTIR de 1700-900cm⁻¹ en carne de ratas infectadas y en donde se describe la facultad de este método de evitar falsos positivos, ya que puede discriminar entre géneros de nematodos. En paralelo, el método se aplicó en músculos (pierna, lomo, costilla, masetero y diafragma) de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* en donde demostró resultados confiables para la identificación del parásito y diferenciación entre carne infectada y no infectada.

3. JUSTIFICACIÓN

La carne constituye una de las bases de la alimentación humana y su industria es una de las más importantes en el ámbito de la alimentación. Se trata de un alimento muy completo por su alto valor nutritivo, debido a la riqueza proteica de su constitución. La carne de cerdo es la carne de mayor consumo en el mundo, dada su importancia nutricional, económica y social.

Hoy en día, entre un 40% y un 50% de la cantidad neta de la carne de porcino es transformada en productos cárnicos. De estos productos, las salchichas y jamones representan un 80% del total de la producción y el resto son otros preparados cárnicos. Sin embargo, la industria cárnica enfrenta problemas por malas prácticas de manufactura y deficiencias sanitarias sin considerar la normatividad. Esta situación genera focos probables de infección que representan un riesgo de salud pública.

Los derivados cárnicos procesados requieren sólo de cumplir con las especificaciones en cuanto a disposiciones físicas, químicas y microbiológicas, por lo que no se considera ninguna técnica aplicada a determinar la presencia de *Trichinella spiralis*, por lo tanto el diagnóstico de esta parasitosis sólo depende de las técnicas de triquinoscopía y digestión artificial aplicadas en la canal de cerdo, ambas técnicas son laboriosas y requieren de mucho tiempo para su realización. Los únicos establecimientos que realizan dichas pruebas son los rastros de tipo inspección federal (TIF).

Diversos estudios han mostrado la factibilidad de identificar con técnica de Espectroscopia Infrarroja adulteraciones en alimentos, y recientemente se aplicó este método en la identificación del nemátodo en carne de cerdo, demostrando con éxito ser una prueba rápida, confiable y de bajo costo, determinando con ello, la extensión de su aplicación para el mismo propósito en alimentos cárnicos procesados; sin la necesidad de un tratamiento previo de la muestra, ni empleo de reactivos o producción de material de desecho.

Adicionalmente, se ha documentado que diferentes procedimientos para estabilizar o sazonar (“carne adobada”, “carne tipo cecina” o simple refrigerado) no afectan la capacidad infectiva de la LM. Actualmente, se carece de información respecto a estudios realizados para determinar si el método de preparación de derivados cárnicos, como salchicha y jamón, tiene algún efecto sobre la capacidad reproductiva de *Trichinella spiralis*.

4. OBJETIVOS

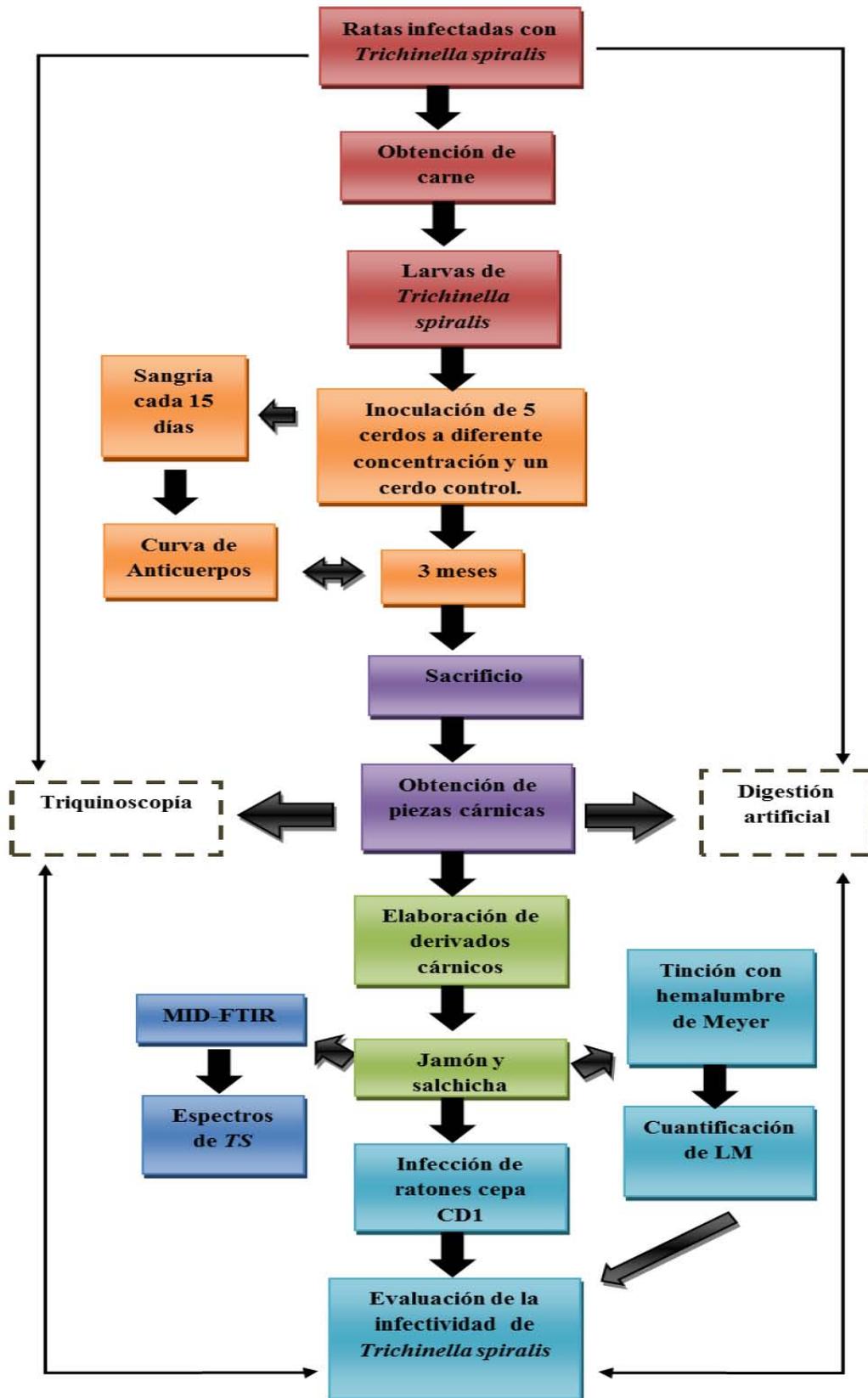
4.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de la espectroscopia de infrarrojo para detectar la presencia del nematodo *Trichinella spiralis* en salchicha y jamón preparados con carne de cerdo infectado experimentalmente

4.2 Objetivos particulares

1. Reproducir experimentalmente la infección por *Trichinella spiralis* en cerdos y evaluar el progreso de la infección por medio de una cinética de anticuerpos empleando la técnica de ELISA.
2. Producir derivados cárnicos (salchicha y jamón) a partir de la carne obtenida de cerdos infectados experimentalmente.
3. Obtener e interpretar los espectros MID-FTIR correspondientes a los derivados cárnicos de cerdo, salchicha y jamón infectados con *T. spiralis*.
4. Determinar la factibilidad del empleo de la espectroscopia de infrarrojo medio (MID-FTIR) para detectar la presencia de *T. spiralis* en salchicha y jamón.
5. Emplear la tinción de Hemalumbre de Meyer para cuantificar LM de *Trichinella spiralis* presentes en salchicha y jamón.
6. Infectar ratones cepa CD1 para determinar la infectividad de LM de *Trichinella spiralis* presentes en salchicha y jamón.

5. Método experimental para detectar LM de *Trichinella spiralis* por medio de espectroscopia de infrarrojo.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reproducción experimental de la infección por *Trichinella spiralis* en ratas.

La propagación de la cepa MSUS/MEX/92/CM-92 *T. spiralis* se realizó en el bioterio del InDRE. Para ello se emplearon cinco ratas Wistar macho de aproximadamente 250 g de peso y seis semanas de edad, las cuales fueron infectadas oralmente con 23 LM por gramo de peso, equivalente a 6000 ± 250 LM suspendidas en un amortiguador de fosfatos (0.01 M) adicionado con NaCl (0.15M) a un pH de 7.2 (PBS) empleando para ello una micropipeta. Cada rata recibió 0.15 ml de la dilución descrita. Durante seis semanas post-infección, las ratas se mantuvieron con un manejo rutinario para animales de laboratorio. Transcurridos los dpi se procedió a la eutanasia por medio de vapores de éter de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.2 Triquinoscopía

Para confirmar la infección de cada una de las ratas con *T. spiralis*, se les retiró el diafragma, el cual fue colocado entre dos portaobjetos, presionados fuertemente y adheridos por medio de cinta adhesiva en ambos extremos, con la finalidad de obtener un diafragma lo más extendido y adelgazado posible. La preparación se observó al microscopio a objetivo de 40x.

6.3 Digestión enzimática

Una vez confirmada la infección de las ratas se procedió a retirar piel, vísceras y cabeza, obteniendo de ésta última lengua y maseteros. La canal fue lavada con agua corriente para retirar el exceso de sangre. Para homogeneizar, la lengua, maseteros y la canal fueron colocados en una trituradora de alimentos. Por cada 100g de muestra, se colocó en un matraz Erlenmeyer un litro de agua destilada, pepsina al 1% (10g) y ácido clorhídrico concentrado al 1% (10ml), ésta solución se

incubó en una estufa a 37°C con agitación continua, con una barra magnética durante 4 horas.

6.4 Obtención de larvas musculares

La digestión enzimática obtenida se vertió a través de una gasa colocada en la boca de un embudo de separación. Después de una hora las larvas sedimentadas, formaron un botón rosa y fueron recolectadas en un tubo de centrifuga. Enseguida las LM fueron lavadas utilizando PBS pH 7.2 y con centrifugación a 3500 rpm durante cinco minutos, eliminando el sobrenadante; estos lavados fueron realizados hasta que el sobrenadante se observó transparente. Posteriormente, con una pipeta Pasteur se retiraron los restos de tejido muscular visible como una capa café formada sobre el botón rosa (larvas musculares). Finalmente, las larvas obtenidas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa al 20, 40 y 80% de concentración de glucosa, para con ello lograr limpiarlas de los restos de tejido. Las larvas se recuperaron de la interface de la concentración de 20-40%, colocándolas en tubos Falcon y se repitieron los lavados con PBS para eliminar el exceso de dextrosa y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Para corroborar la viabilidad de las larvas, el tubo cónico se agitó y se tomó con una micropipeta una muestra de 5µl, la cual fue colocada en un portaobjetos para observar al microscopio a 40x el desplazamiento larvario.

6.5 Inoculación de cerdos

Después de confirmar la viabilidad de las LM, se tomaron tres muestras con una micropipeta, cada una de 5µl, previa agitación del tubo por tres segundos en cada toma. Las tres gotas se colocaron en un portaobjetos y fueron observadas al microscopio para cuantificar las LM en cada gota, obteniéndose la media y de esta manera se procedió a realizar una regla de tres para determinar los microlitos necesarios para obtener la cantidad de LM a inocular a cada cerdo.

Para esta fase, se emplearon seis cerdos cruza de las razas York Shire-Landrace, tres hembras y tres machos de cuatro semanas de edad (13 kg aproximadamente), cinco cerdos se infectaron manteniendo a uno como control

negativo. Los cerdos se infectaron via oral con las LM obtenidas, a distintas concentraciones: 13,000; 6500; 3500; 1625; 812 larvas/cerdo.

Después de la infección, los cerdos fueron alojados en un área de confinamiento ubicada en las instalaciones de la FES Cuautitlán Campo 4. Dicha área estaba provista de comedero y bebedero, así como de los requerimientos necesarios de acuerdo a lo estipulado en la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. A su llegada los cerdos fueron identificados con crayón pintura como: cerdo testigo (CT), y los cerdos infectados (C1, C2, C3, C4, C5), correspondiendo C1 a la concentración de inóculo más alta y C5 a la concentración más baja; tanto el cerdo testigo como los cerdos infectados recibieron un manejo rutinario de alimentación y lavado de instalaciones por 24 semanas.

La alimentación fue con alimento comercial balanceado, de acuerdo con el peso de los animales: Iniciador: 8-12 kg de PV; Desarrollo 12-25 kg de PV; Finalizador >25 kg de PV .Los cerdos fueron monitoreados cada 15 días para revelar los anticuerpos séricos a partir de la infección con larvas musculares de *Trichinella spiralis*. De igual forma, previa a la infección se realizó una prueba de ELISA para verificar la ausencia de anticuerpos contra *Trichinella* mediante la toma de muestra sanguínea a cada animal por punción en vena cava craneal.

6.6 Toma de muestras sanguíneas

Para la obtención de muestras sanguíneas se procedió a fijar una aguja 22Gx32mm en el aplicador sin quitar el capuchón de la parte exterior de la aguja. A continuación se colocó un tubo estéril sin anticoagulante dentro del aplicador, sin presionar hacia la aguja. A su vez se sujetó al animal con un lazo de sujeción a partir del maxilar superior procurando que el lazo quedara situado en la posición más caudal posible (detrás de los colmillos).

Se procuró que el animal tuviera el cuello en la misma línea del resto del cuerpo y la cabeza ligeramente alzada. Hecho lo anterior, una persona se ubicó delante del

animal para proceder a quitar el capuchón de la aguja y tocar con una mano la zona a introducir la aguja y así evitar que el animal hiciera movimientos muy bruscos. Posteriormente se introdujo la aguja en el punto medio de la fosa yugular, en dirección dorso-medio-caudal. Mientras se introdujo la aguja, se presionó al mismo tiempo el tubo para que se produjera el vacío y entrara la sangre. Cada tubo fue debidamente identificado con marcador indeleble.

6.7 Procesamiento de muestras

Los tubos con muestras de sangre fueron mantenidos en baño maría a 37°C para facilitar la retracción del coágulo y posteriormente centrifugados a 1500 rpm durante 10 minutos, acto seguido con una pipeta Pasteur se retiró el suero obtenido y vertido en tubos Eppendorf a modo de alícuotas apropiadamente identificados. Las muestras ya procesadas se trasladaron al laboratorio de Inmunoparasitología (antes Helmintos Tisulares) del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica, para su conservación por medio de congelación a - 4°C y posterior empleo en la realización de la técnica de ELISA.

6.8 Titulación de conjugado y suero

La titulación del conjugado comercial anti-cerdo se realizó por la técnica de ELISA. Se utilizó un conjugado anti IgG de porcino acoplado con peroxidasa, así como placas para ELISA Corning-Costar 3590. Se sensibilizó la placa con antígenos preparados a una concentración de 5 µg/ml, para agregar 50 µl por pozo. El conjugado se tituló en base a las siguientes diluciones: 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000. Empleando pozos blanco, sueros positivos y negativos. Y llevando a cabo cada uno de los pasos correspondientes a la técnica de ELISA.

6.9 Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos séricos (ELISA)

Primero se procedió a crear una hoja de control en la cual se especificó cuales serían los pozos de poliestireno de fondo plano de la placa para ELISA (Costar; cat. 3590) que corresponderían a los sitios de reacción para los testigos positivos,

testigos negativos, testigo blanco y muestras problema. Las muestras se procesaron por duplicado.

Sensibilización Los pozos de la placa de ELISA de alta unión, se sensibilizaron utilizando el antígeno a una concentración de 5 µg/ml para un volumen de 50 µl por pozo. El antígeno se diluyó en una solución amortiguadora 0.1M de carbonatos pH 9.6. Al finalizar, la placa de ELISA se cubrió con papel parafilm y se incubó a 4°C toda la noche.

Lavado Al día siguiente, la solución contenida en los pozos fue eliminada con un movimiento brusco virtiéndola en la tarja. La placa se lavó tres veces con 200 µl/pozo con una solución 0.01M de PBS-T, pH 7.2 (PBS-T). Los lavados se realizaron con un lavador de placas automático.

Bloqueo El bloqueo de la placa se realizó colocando 200 µl/pozo de una solución de Albúmina Sérica Bovina (ABS) al 1%. Y se prosiguió a cubrir la placa con papel parafilm para incubarla durante una hora en estufa a 37°C.

Dilución de las muestras Transcurrido el tiempo indicado, la placa fue dirigida al proceso de lavado, para después colocar un volumen de 50 µl/pozo de suero a una dilución de 1:500, dicha solución se hizo en PBS-T. La placa se incubó a 37°C en estufa por 30 minutos.

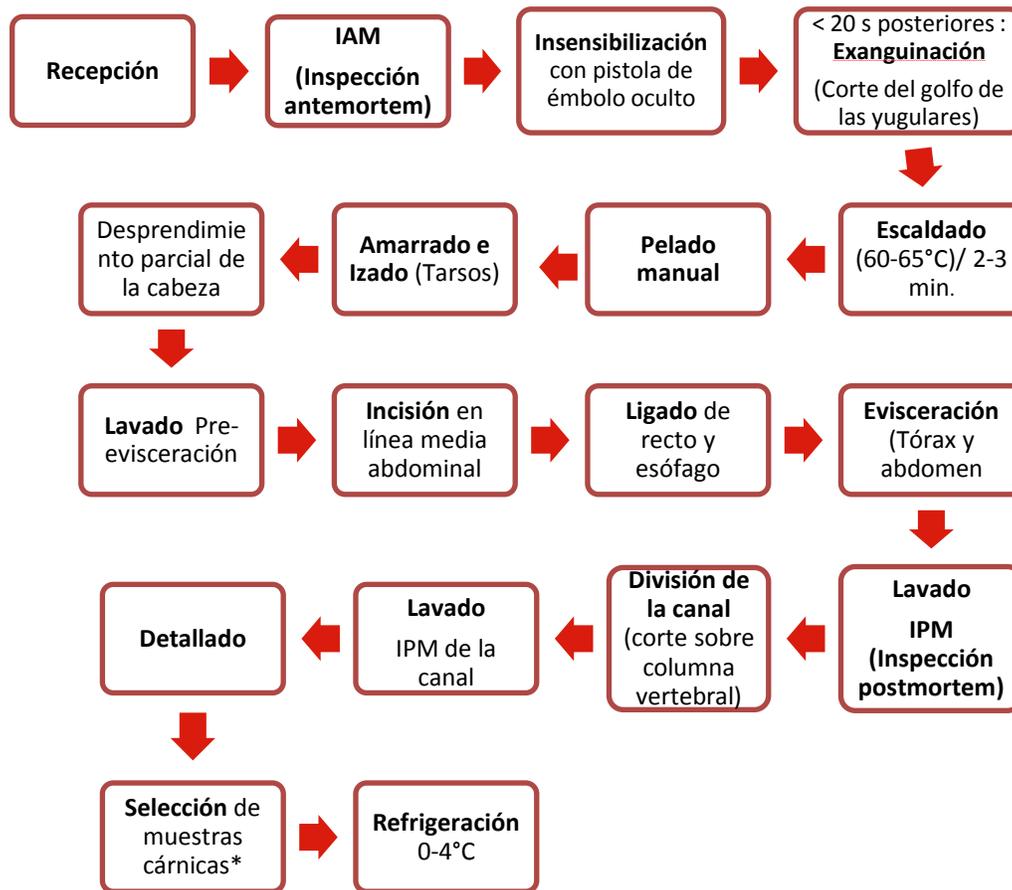
Conjugado Se realizó el proceso de lavado, a continuación se preparó una dilución 1:4000 con el conjugado anti-cerdo acoplado con peroxidasa diluido en PBS-T para un volumen de 50 µl/pozo. Nuevamente la placa se incubó a 37°C en estufa por 30 minutos

Sustrato Se procedió al lavado de la placa, y a su vez preparar el sustrato (Peróxido 30%, Buffer citrato Fosfato, Ortofenildiamina) para agregar 50 µl/pozo. Al término de ello la placa se cubrió de la luz y se esperó a observar la reacción enzimática manifestándose como un cambio de coloración a amarillo paja de los sueros negativos.

Paro de reacción Para detener la reacción enzimática se añadió 50 µl/pozo de una solución de H₂SO₄ 2N. Finalmente, la lectura se llevó a cabo en un lector de ELISA a 490 nm.

6.10 Transporte y sacrificio de los cerdos

Trancurridas las 24 semanas, los cerdos fueron sacrificados con un intervalo de 15 días entre cada uno. Para tal fin los cerdos fueron movilizados desde el área de confinamiento al rastro, el cual se ubica en el Centro de Producción Agropecuaria dentro de las instalaciones de la FES-Cuautitlán. Y basados en la NOM-051-ZOO1995, Trato humanitario en la movilización de animales. Los procedimientos realizados dentro de las instalaciones del rastro estuvieron sustentados por la NOM-009-ZOO-1994, Proceso sanitario de la carne. La secuencia de sacrificio de cada uno de los cerdos se muestra en la Figura 14.



*Las primeras muestras a considerar, fueron aquellas destinadas a la triquinoscopía: la lengua, el diafragma y los maseteros.

Figura 14. Secuencia de sacrificio de los cerdos. Posterior a la inspección antemortem, se procedió a la insensibilización con pistola de émbolo oculto, apoyándola en la mitad de la frente, 2 cm por encima de una línea imaginaria que une los ojos. Inmediatamente se realizó la exanguinación. El paso siguiente fue el escaldado cuyo objeto fue ablandar la piel para facilitar el pelado manual; para tal fin, el animal se sumergió en agua caliente. Bajo los tendones flexores se izó al animal para continuar con el desprendimiento parcial de la cabeza y realizar un lavado. Después se practicó un corte en línea media para ligar recto y esófago y de esta manera se evitó contaminación alguna durante la evisceración. Se continuó con un lavado e inspección postmortem de las vísceras, mientras se dividió la canal por medio de un corte sagital y proseguir con un lavado e inspección postmortem de la misma. Finalmente la canal fue limpiada y conservada en refrigeración a 4°C hasta el siguiente proceso.

Para la obtención de las piezas cárnicas necesarias en la elaboración de los embutidos, fue necesario realizar el deshuesado y retiro de grasa en las instalaciones del Taller de carnes de la FES-Cuautitlán, y así, obtener el brazuelo, pierna, espaldilla, costillar y la grasa, piezas que fueron empacadas y conservadas en refrigeración a 4°C por un tiempo no mayor a una semana para su posterior utilización.

6.11 Elaboración de derivados cárnicos

La elaboración tanto de la salchicha como el jamón se realizó en las instalaciones del Taller de alimentos de la FES-Cuautitlán, considerando para ello la NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Los ingredientes y proceso de cada producto se describe a continuación:

6.11.1 Jamón

Para formular el jamón se siguió la descripción que se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Ingredientes empleados en la elaboración de jamón.

Ingredientes	
Pulpa de cerdo (pierna)	605 g
Agua	350 ml
Sal	13.3 g
Azúcar	4.2 g
Sal de cura	12.0 g
Fosfato de Sodio	9.0 g
Condimento para jamón (California)	6 g
Eritorbato de Sodio	1.99 g
Glutamato monosódico	0.18 g
Carragenina	4.2 g

1. PREPARACIÓN DE LA CARNE: se preparó la carne correspondiente a la sección de la pierna, de tal manera, que se eliminó con cuchillo el exceso de grasa, los tendones y ligamentos. Acto seguido la pulpa obtenida se colocó en el molino para procesarla y reducir aún más el tamaño de los trozos de carne.
2. PREPARACIÓN DE LA SALMUERA: los ingredientes fueron pesados en balanza granataria. Posteriormente, el fosfato se disolvió por separado en una tercera parte de agua y se adicionaron el resto de los ingredientes con agitación para evitar su precipitación.
3. CURADO DE LA CARNE: la carne se colocó en un recipiente y se añadió la salmuera para mezclarlos hasta obtener una mezcla homogénea. Hecho lo anterior, el recipiente se cubrió perfectamente con plástico adherible y se puso en condiciones de refrigeración a 4°C por 24 horas.
4. FORJADO: al día siguiente la carne curada se colocó dentro de una funda la cual previamente ya fue anudada fuertemente con hilo de un extremo. Se optó por golpearla contra la mesa para eliminar en lo posible el aire y acomodar la carne. Enseguida, la preparación se puso en la máquina de vacío para retirar cualquier presencia de aire y posteriormente anudar fuertemente con hilo el extremo libre de la funda. A continuación, el producto obtenido se empacó al vacío.
5. COCCIÓN: para iniciar el proceso de cocción, el producto se colocó dentro de un recipiente con agua caliente (80+/- 1°C) por 50 minutos, manteniendo la temperatura constante con apoyo de un termómetro.
6. CHOQUE TÉRMICO: transcurrido el tiempo, inmediatamente se retiró el producto del agua caliente y se enfrió por 5 minutos en agua con hielo.
7. REFRIGERACIÓN: para su conservación, el producto ya terminado se etiquetó y almacenó a 4°C.

6.11.2 Salchicha

Para formular la salchicha se siguió la descripción que se muestra en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Ingredientes empleados en la elaboración de salchicha

Ingredientes	
Carne de cerdo	595 g
Grasa de cerdo	171.4 g
Hielo	330.2 g
Fécula de maíz	92.2 g
Sal	33.0 g
Fosfato de Sodio	5.2 g
Eritorbato de Sodio	1.3 g
Sal de cura	5.3 g
Funda artificial	1 pza.

1. **PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA:** se prepararon las piezas cárnicas (brazuelo, espaldilla, costillar), con el empleo de un cuchillo para eliminar el exceso de grasa, tendones y ligamentos para obtener trozos de carne lo más pequeños posible. De igual forma, se procedió a cortar la grasa en trozos pequeños.
2. **MOLIENDA:** para facilitar la formación de la emulsión sólo la carne se pasó un par de veces por el molino. Enseguida, se añadió a la carne la tercera parte de hielo, la sal y la sal de cura para el curtido.
3. **ADICIÓN DE LA GRASA:** con el molino funcionando se adicionó la grasa la cual fue encapsulada por las proteínas y formó la emulsión, a su vez, por la fricción de la cuchilla hubo un aumento de la temperatura en la pasta, con lo que la partícula de grasa aumentó su volumen.
4. **ADICIÓN DE HIELO:** sin detener el molino, se adicionó otra tercera parte del hielo con lo que la grasa redujo su volumen y se evitó que se separara de la

proteína. A los 30 segundos se añadió lentamente la fécula que al incorporarse formó una pasta emulsificada.

5. ADICIÓN DE SALES: sin detener el molino, se adicionó el eritorbato de sodio, el último tercio de hielo y el fosfato. En este paso, se procuró evitar la elevación de la temperatura de la pasta para conservar la emulsión.
6. EMBUTIDO: se detuvo la operación del molino y la pasta se colocó en el fondo de la embutidora la cual estaba provista de una boquilla de 1 cm de diámetro. La boquilla se cubrió con una capa de aceite vegetal para luego introducir la funda de celofán la cual se anudó en el extremo contrario, entonces, con la presión regulada de la embutidora se procedió a embutir la pasta hasta obtener aproximadamente 1.5 m de longitud. A continuación, se fraccionó cada 10-12 cm empleando hilo para anudar cada fracción.
7. COCCIÓN: para la cocción, las salchichas primero fueron empaquetadas al vacío, hecho esto se colocaron en un recipiente con agua a 72°C, +/- 1°C, durante 20 minutos, con monitoreo constante de la temperatura.
8. CHOQUE TÉRMICO: transcurrido el tiempo, inmediatamente se retiran las salchichas del agua caliente y se enfría por 5 minutos en agua con hielo.
9. REFRIGERACIÓN: para su conservación, el producto ya terminado se etiquetó y almacenó a 4°C.

6.12 Pruebas preliminares para la aplicación de FTIR-HATR a derivados cárnicos.

Para la aplicación de FTIR-HATR en la identificación de *Trichinella spiralis* en salchicha y jamón derivados de cerdo, fue necesario un proceso previo de estandarización. El cual fue validado inicialmente en un modelo murino para posteriormente desarrollarse en la carne de cerdo.

6.12.1 Modelo experimental murino

Un total de 20 ratas (obtenidas del InDRE) se dividieron en dos grupos de diez; el primero se constituyó como el grupo de ratas no infectadas) y el segundo de ratas infectadas con una dosis de 7000 larvas musculares (LM).

Las ratas no infectadas se sacrificaron, evisceraron y pelaron; la canal fue colocada en una trituradora de alimentos hasta formar una pasta homogénea y tomar la muestra para su análisis en el Espectroscopio GX.

Las ratas infectadas se sacrificaron evisceraron y pelaron después de 30 dpi y se les realizó digestión artificial y triquinoscopía. Las LM obtenidas de la digestión artificial se cuantificaron en el microscopio óptico para posteriormente dividirse en tres grupos hasta formar un número total de 25 muestras con diferente número de LM, el primer grupo fue de 1 a 10 larvas, el segundo de 100 a 1000 y el tercero de 1000 a 5000. Cada muestra de larvas se mezcló con 10 g de carne molida de rata no infectada la cual se molió y homogenizó para obtener la muestra final.

A continuación, a las muestras correspondientes tanto a la rata no infectada como a la carne mezclada con larvas se les tomaron los espectros por triplicado, para con estos datos elaborar el modelo de calibración multivariable cualitativo para lo cual fueron necesarios 20 espectros de carne de rata no infectada y 25 de carne de rata mezclada con LM. Para validar el modelo se ocuparon 20 espectros de carne de rata infectada experimentalmente. En donde la región de análisis fue de 1700 a 900 cm^{-1} denominada también “región de la huella digital” (Gómez de-Anda *et al.*, 2012).

6.12.2 Prueba previa para la aplicación de FTIR-HATR a cerdos infectados

Con el propósito de evaluar la viabilidad de llevar la metodología a cerdos infectados con larvas de *T. spiralis* se hicieron pruebas preliminares en las que se analizaron cinco lenguas tanto de rata como de cerdo sin infectar; éstas se molieron por cinco minutos en un procesador de alimentos hasta formar una pasta homogénea para su análisis en el Espectroscopio GX. Del total de espectros obtenidos se tomaron 15 de cada muestra para realizar el modelo de calibración cualitativo multivariable (Gómez de-Anda *et al.*, 2012).

6.12.3 Obtención de espectros FTIR-HATR de muestras de carne de cerdo infectado con *Trichinella spiralis* y de cerdo no infectado.

Para la obtención de los espectros, se tomaron muestras musculares provenientes de los cerdos infectados experimentalmente: masetero, diafragma, pierna, lomo y costilla. Las cuales se homogeneizaron en un procesador de alimentos por cinco minutos, para su determinación en la espectroscopia de infrarrojo.

Posteriormente en el laboratorio y a temperatura ambiente se empleó el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR). Los espectros se registraron a una resolución de 4cm^{-1} en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} con 64 barridos, con la finalidad de obtener una lectura del espectro con mejor resolución en los picos de absorbancia FTIR. Se aseguró que la muestra y el cristal de selenito de Zinc (ZnSe) tuvieran un buen contacto, después de cada determinación el HATR se limpió con detergente para cristalería de laboratorio (Extran®) al 10 % hasta dejar limpia la superficie.

Para construir el modelo se utilizaron los mejores espectros, en total 100, de carne de cerdo infectado con *T. spiralis* y 100 de cerdo control. Para validar el modelo se utilizaron 50 espectros de carne de cerdo infectada y 50 espectros de carne de cerdo sin infectar. En donde la región de análisis fue de 1700 a 900 cm^{-1} o sea, la región de la huella digital (Gómez de-Anda *et al.*, 2012).

6.13 Obtención de espectros MID-FTIR-HART de muestras de salchicha y jamón

Los espectros, tanto de las salchichas como del jamón de los cerdos infectados y el no infectado, fueron obtenidos en un espacio a temperatura ambiente, empleando un espectrofotómetro MID-FTIR (Spectrum GX, Perkin Elmer Modelo GX) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado. Para el análisis se utilizó el elemento HATR, en donde la muestra de salchicha y jamón de aproximadamente 1g se colocó directamente sobre la platina de la estación de muestra, después, la superficie de la muestra se presionó para tener un contacto óptico con la superficie del cristal para permitir que la radiación IR pasara a través

del cristal con alto índice de refracción, en este caso fue un cristal de selenito de zinc desmontable, permitiendo así que la radiación se reflejara dentro del elemento HATR varias veces.

La mecánica del proceso incluye el paso de la radiación IR del espectrofotómetro por el cristal y luego refleja el rayo dentro del mismo y penetra en una pequeña cantidad de muestra con cada reflexión a lo largo de la superficie. Al final, el rayo sale a través del cristal hacia el espectrómetro. Los espectros se obtuvieron y procesaron con el software Spectrum versión 3.01.00 (Perkin Elmer, Inc.). Los espectros de las muestras fueron recopilados y de igual forma se obtuvo un espectro blanco, es decir, sin presencia de muestra. Los espectros se escanearon sobre un rango de número de onda de 4000-650 cm^{-1} con un promedio de 64 escaneos a una resolución de 4 cm^{-1} .

El cristal fue limpiado entre cada muestra con detergente Extran® al 10%, y posteriormente con agua destilada y secado con papel limpia-lentes. Luego el cristal se examinó cuidadosamente para asegurarse de que ningún residuo de la muestra anterior quedara retenido en la superficie del mismo verificando posteriormente con el espectro blanco.

6.14 Cuantificación de LM en salchicha y jamón por medio de Tinción de Hemalumbre de Mayer

Para lograr la observación y por ende la cuantificación de las LM presentes en cada uno de los derivados cárnicos se desarrolló un tren de tinción empleando el colorante Hemalumbre de Mayer. Para ello, lo primero fue obtener por duplicado un gramo de muestra en rebanadas tanto de salchicha como de jamón de 0.1mm de grosor con el uso de una rebanadora de carnes frías. Las rebanadas fueron sometidas al tren de tinción indicado en el cuadro 6. Al obtener las preparaciones fueron observadas a través del microscopio óptico a 10x, y se realizó la cuantificación de las LM de cada grupo de muestras para luego calcular la media.

Cuadro 6. Tren de tinción con Hemalumbre de Mayer

Reactivo	Tiempo de exposición	
	Salchicha	Jamón
Éter	1 hora	*****
Formol 10%	12 horas	12 horas
Colorante Hemalumbre de Mayer	15 minutos	15 minutos
Alcohol ácido 70%	15 minutos	15 minutos
Alcohol 80%	15 minutos	15 minutos
Alcohol 90%	15 minutos	15 minutos
Alcohol 96%	15 minutos	15 minutos
Alcohol absoluto	15 minutos	15 minutos
Salicilato de metilo	20 minutos	20 minutos
Montaje en portaobjetos + Entellan + cubreobjetos	No mover la preparación hasta secar completamente.	

6.15 Infección de ratones cepa CD1 y evaluación de la infectividad de *Trichinella spiralis*

Para determinar la capacidad infectiva de las larvas que se encontraban en los embutidos, se suministró a 36 ratones de la cepa CD1 los productos cárnicos, los animales se subdividieron en dos grupos denominados: a) infectados por medio de jamón, b) aquellos por salchicha; así como identificados según al cerdo del que provenía el subproducto proporcionado. Aquellos infectados por medio de jamón se marcaron con azul de metileno. Tres ratones correspondían a cada grupo. Se calculó la cantidad de gramos de producto a proporcionar a cada ratón (Cuadro No.7) en base a que cada uno recibiera un promedio de 50 LM, basados en la cuantificación previa y por medio de una regla de tres.

Cuadro 7. Gramos de salchicha y jamón administrado a cada ratón.

Producto	Embutido administrado por ratón (g)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Jamón	0.27	0.48	0.40	0.093	0.90	0.26
Salchicha	0.14	0.53	0.47	0.17	0.11	0.28

Los gramos indicados fueron dados a cada ratón; a los 30 dpi los ratones fueron sacrificados y se procedió a realizar triquinoscopía y digestión artificial a cada uno.

Los embutidos se prepararon a partir de carne de cerdo infectados con 13,000 (C1), 6500 (C2), 3500 (C3), 1625 (C4), 812 larvas/cerdo (C5) y cerdo sin infectar (C6).

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de LM de *Trichinella spiralis* a partir de ratas infectadas experimentalmente

Se obtuvieron las larvas musculares de *Trichinella spiralis* a partir de músculo esquelético de ratas infectadas experimentalmente, las cuales se emplean en el InDRE para conservar la cepa y a su vez, en este trabajo, fueron usadas como inóculo para infectar experimentalmente a los cerdos. Las figuras 15A y 15B muestran una triquinoscopía del diafragma de rata en donde se observa la presencia de las larvas. Con la realización de esta técnica se comprobó la infección en las ratas por *T. spiralis*.

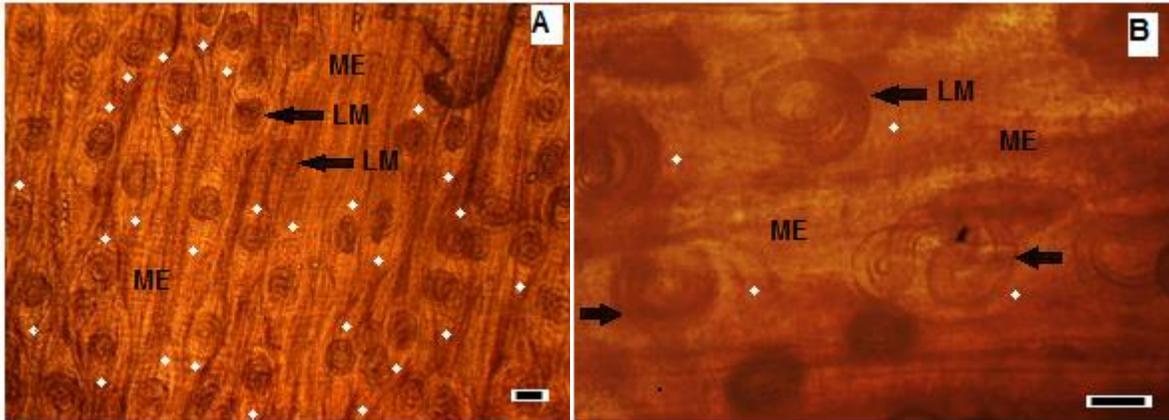


Figura 15. Triquinoscopia: LM de *Trichinella spiralis* en músculo de rata. Imagen 10x (izquierda); imagen 40x (derecha). Se observan las larvas de *T. spiralis* encapsuladas en el diafragma de las ratas, en donde se distingue la larva muscular (LM-flechas), las células nodrizas (rombos blancos) y músculo esquelético (ME). La barra mide 100 µm.

Para obtener las larvas musculares se realizó el proceso de la digestión enzimática. Para ello, las ratas ya sacrificadas, sin piel y evisceradas se homogeneizaron en una trituradora de alimentos. Por cada 100 g de muestra se utilizó 1L de agua destilada, 10 g de pepsina al 1% y 10 ml de ácido clorhídrico concentrado al 1%, la solución obtenida se incubó en estufa a 37°C por 4 horas con agitación continua.

El sedimento de la digestión obtenida se vertió en un embudo de separación, posteriormente se recolectaron las larvas sedimentadas y se sometieron a lavados con PBS pH 7.2 y centrifugación a 3500 rpm/5min. Por último las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa para recolectarlas de la interfase en la concentración de 20-40%, repitiendo a continuación los lavados con PBS.

Para corroborar la viabilidad de las larvas se tomaron con una micropipeta cinco muestras de 5 μ l cada una y por medio de un microscopio de campo claro se visualizó el desplazamiento larvario para dar paso al conteo, del cual se obtuvo una media de 210 LM por 5 μ l de muestra. En la Figura 16 se observan las larvas libres del músculo de rata.

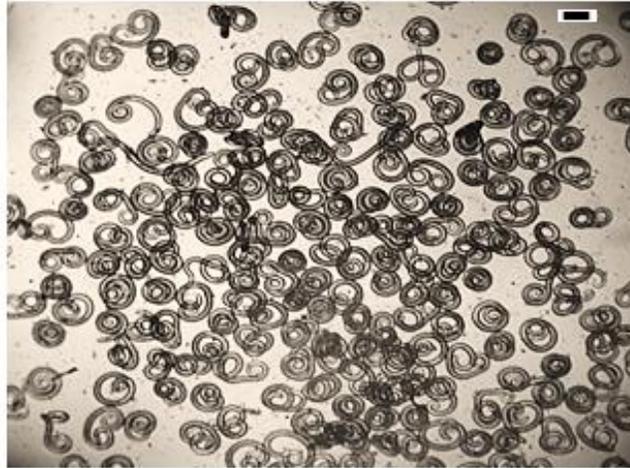


Figura 16. Digestión enzimática. Larvas musculares de *Trichinella spiralis* libres del músculo de rata en 5 μ l de sedimento de la digestión artificial. Imagen 10x. La barra mide 100 μ m

7.2 Carga parasitaria en ratas infectadas experimentalmente

Cinco ratas fueron inoculadas según su peso, a una dosis de 23 LM de *Trichinella spiralis* por gramo lo cual mostró un equivalente de 6000 ± 250 LM totales administradas vía oral, como se puede observar en la tercera columna del Cuadro 8.

Como resultado de la infección severa, se logró una carga parasitaria de 800 ± 150 LM por gramo en promedio por cada rata infectada experimentalmente (Cuadro 8).

No. de rata	Peso (g)	Total de LM de <i>T. spiralis</i> inoculadas VO (LM)	Carga parasitaria (LM/g)
1	260	5980	822
2	250	5750	801
3	261	6003	829
4	253	5819	811
5	270	6210	906

Cuadro 8. Carga parasitaria en ratas. En relación al peso y las LM

7.3 Cinética de producción de anticuerpos por la técnica de ELISA.

Para la búsqueda de anticuerpos séricos, cada uno de los cerdos fue monitoreado durante 105 dpi. Obteniéndose una muestra de suero (5 ml de sangre) cada quince días. El suero se procesó mediante la técnica del ELISA con antígenos E-S. Los resultados, expresados en la Figura 17 muestran un claro comportamiento diferencial entre la respuesta inmunológica de los cerdos infectados y la del cerdo no infectado. En el primer caso se presentan títulos de anticuerpos IgG (como unidades de densidad óptica) a partir de las tres semanas postinfección (21días) los cuales se mantuvieron hasta finalizado el estudio, mientras el cerdo no infectado se conservó sin respuesta inmunológica. En cuanto a la concentración de larvas, ésta no provocó cambios en la concentración de anticuerpos en los animales, es decir, el grado de respuesta inmunológica en cada uno de los animales no fue dependiente de la dosis suministrada.

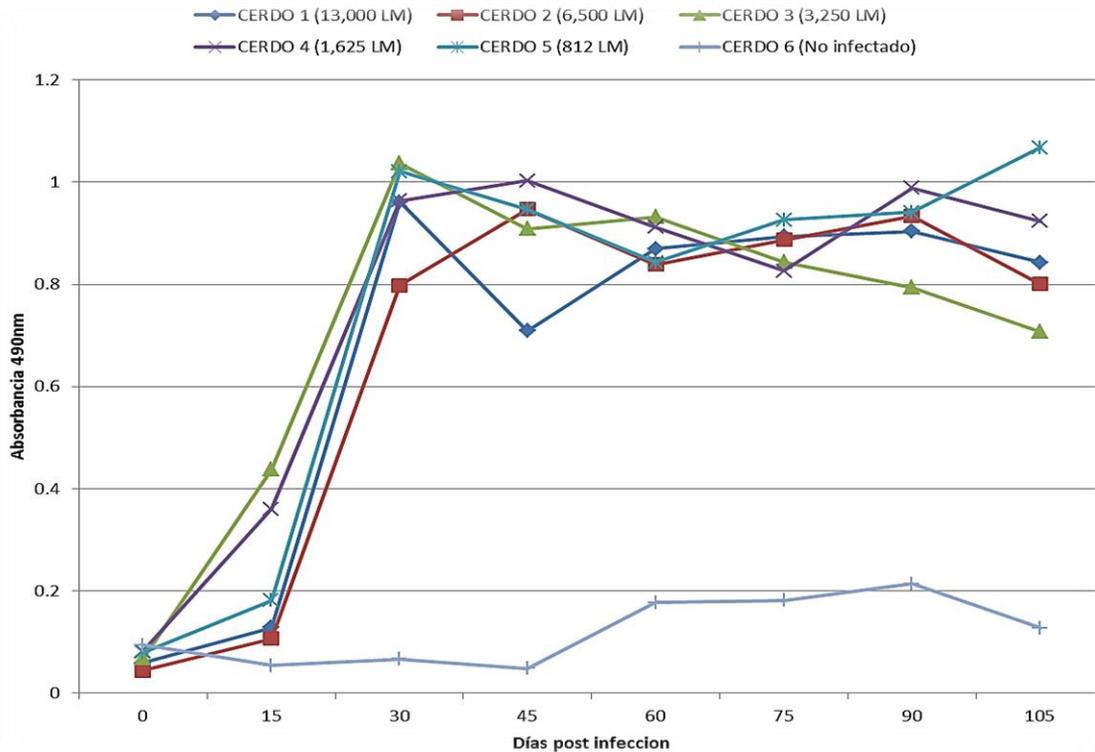


Figura 17. Determinación por ELISA de la evolución de las concentraciones de anticuerpos en sueros de cerdos infectados con diferentes cargas parasitarias. Se muestra un incremento de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en función al tiempo. Nótese que a partir del día 30 pi, los sueros de los cerdos 1 al 5 registran una absorbancia de 0.8 o mayor equivalente al aumento de anticuerpos anti-*T. spiralis* y los cuales tienen una persistencia prácticamente hasta los 105 dpi. Mientras que el suero del cerdo 6 (testigo negativo) se mantiene por debajo de una absorbancia de 0.3 considerándose como negativo a *T. spiralis*.

7.4 Carga parasitaria en carne de cerdos infectados experimentalmente.

Los resultados en cuanto a la cantidad de larvas detectadas usando las técnicas de triquinoscopía y digestión artificial a partir de los diferentes grupos musculares de los cerdos infectados se observan en la Figura 18. Los resultados indican que no hay diferencia significativa entre la cantidad de larvas en costilla, lomo o pierna (elegidos por ser los músculos de mayor consumo comercial) sin embargo una diferencia notable se observa con el diafragma y los maseteros (músculos que se ocupan en los rastros para la inspección sanitaria) ya que en estas regiones

anatómicas se detecta la mayor cantidad de larvas. Realizando un análisis comparativo entre los músculos con mayor carga parasitaria y el resto, se detectó un rendimiento cinco veces mayor en el caso del diafragma y tres veces mayor en el caso del músculo masetero en relación al resto. Asimismo se distingue que el diafragma concentra la mayor cantidad de larvas musculares en todos los casos, por tanto la distribución de la carga parasitaria no es dosis dependiente. De igual forma queda clara la sensibilidad tanto de la triquinoscopía como de la digestión artificial para la detección y concentración de larvas.

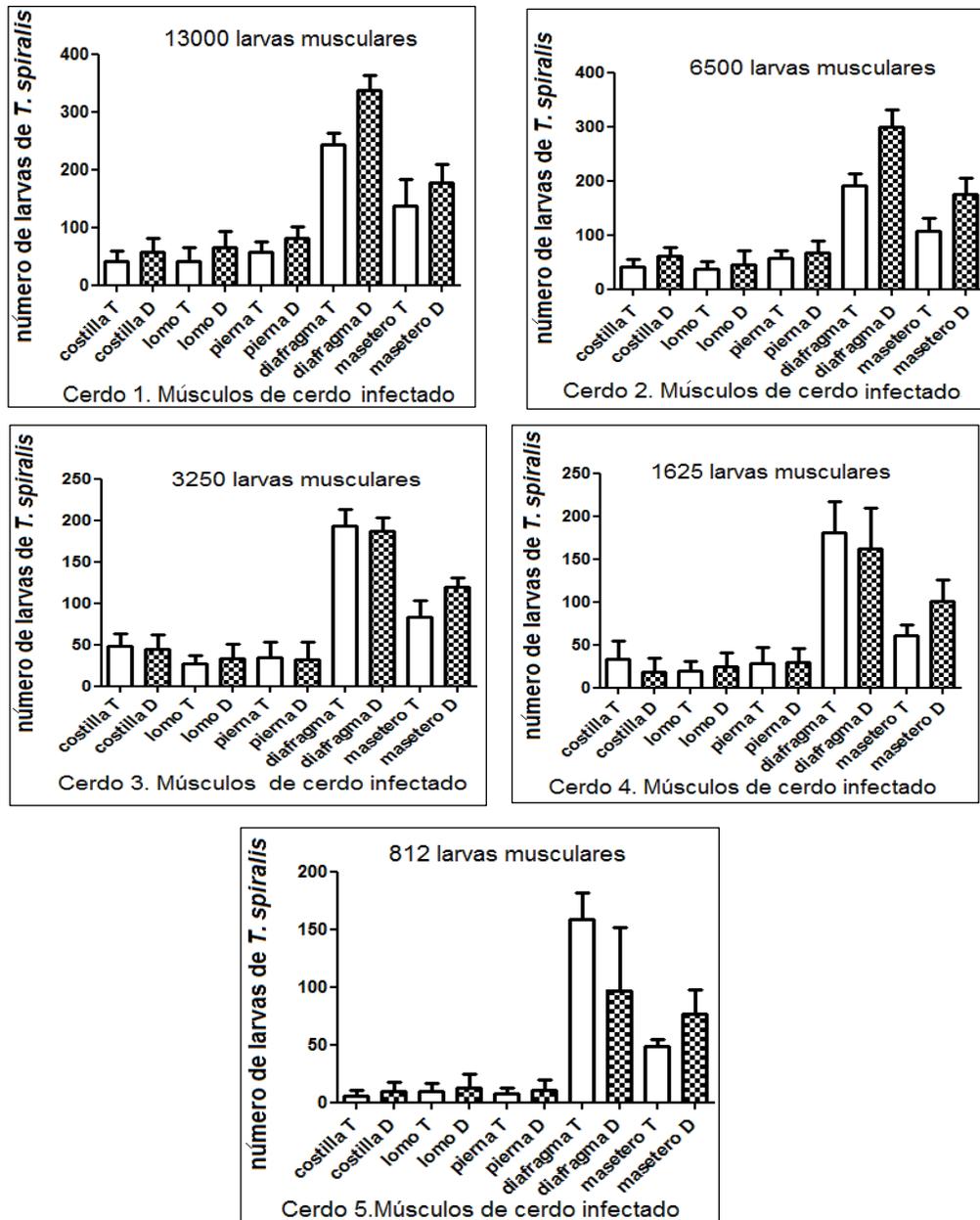


Figura 18. Carga parasitaria de larvas de *T. spiralis* cuantificada en diferentes regiones anatómicas de cerdos infectados experimentalmente vía oral con dosis de: 1300 LM (cerdo 1); 6500 LM (cerdo 2); 3250 LM (cerdo 3); 1625 LM (cerdo 4); 812 LM (cerdo 5). Se tomaron muestras cárnicas de costilla, lomo, pierna, además de diafragma y masetero. Todas ellas fueron examinadas por digestión artificial (D) y por triquinoscopia (T), con el modelo ANOVA se detectó la diferencia ($P=0,725$) entre ambos métodos en relación a la concentración de larvas y a su vez, se hicieron las comparaciones de medias con la prueba de TUKEY ($P>0,05$) con un nivel de confianza del 99.33% para determinar la diferencia entre regiones anatómicas. Se observan los gráficos correspondientes a cada cerdo infectado que indican el rendimiento de larvas de *T. spiralis* de acuerdo a los grupos musculares estudiados y el método de cuantificación empleado.

7.5 Derivados cárnicos: salchicha y jamón

Se elaboraron dos tipos de derivados cárnicos: salchicha y jamón, a partir de carne de cerdos infectados experimentalmente, con el fin de identificar la larva muscular de *Trichinella spiralis* por medio de la espectroscopia de infrarrojo y simultáneamente comprobar la capacidad infectiva del parásito después de ser procesadas las masas musculares.

Para la elaboración del jamón, se aprovechó la carne de la pierna. La cual se sometió al proceso de curado por 24h a 4°C, se embutió y empacó al vacío. Acto seguido fue la cocción a temperatura constante de 80 +/- 1°C por 50 minutos. Finalmente se sometieron a choque térmico procediendo a refrigerar a 4°C.

Para la preparación de la salchicha, se empleó la carne del brazuelo, espaldilla y costillar. La cual se colocó junto con el resto de los ingredientes en un molino para carne, para obtener una emulsión. Después se embutió en una funda artificial de 20 mm de diámetro aproximadamente. La cocción fue posterior al empaque al vacío a una temperatura constante de 72°C +/- 1°C por 20 minutos. De igual forma que con el jamón, se aplicó un choque térmico y el producto se mantuvo en refrigeración.

A partir de 600g de carne para cada derivado cárnico se obtuvo un producto terminado de 1000 g +/- 50g en el caso del jamón ó 15 +/- 2 salchichas de 10 cm cada una, equivalente a 750 +/- 100 g. El tiempo de preparación difiere considerablemente, ya que para el jamón se requiere un proceso de curado por 24h, mientras que para la salchicha se invierte un tiempo promedio de 4 h en total. En la Figura 19 se visualizan ambos productos terminados empacados al vacío y listos para refrigerarse.

Al transformar la carne en este tipo de derivados cárnicos se logra un periodo prolongado de conservación hasta de 30 días a partir de su fecha de elaboración. Y se consiguió un rendimiento promedio del 67% en el jamón y del 25% en el caso de salchichas en relación a la cantidad de carne empleada.



Figura 19. Producto terminado, empacado al vacío. Salchichas (izquierda) con un peso 750g y jamón (derecha) con un peso de 950g

7.6 Espectro de *Trichinella spiralis*

Para determinar la factibilidad de que el espectro de infrarrojo por Transformada de Fourier identificara la larva de *Trichinella spiralis* se realizaron pruebas preliminares en la materia prima (carne de rata y larva muscular). Se empleó el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR) con un cristal de seleniuro de zinc. Los espectros se registraron a una resolución de 4cm^{-1} en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} con 64 barridos, con la finalidad de obtener una lectura del espectro con mejor resolución en los picos de absorbancia FTIR. Observándose los picos más significativos del parásito en la región $1700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Figura 20).

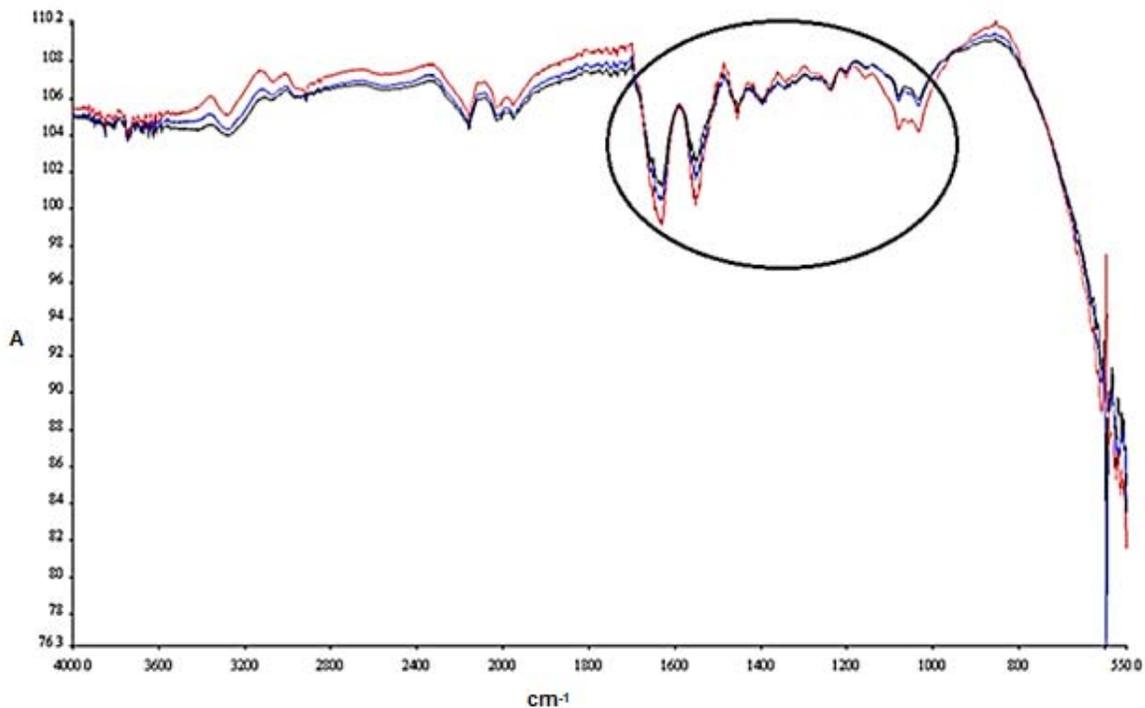


Figura 20. Espectros de las larva de *Trichinella spiralis* detectados por espectrofotometría. Se muestra la absorbancia en función de la longitud de onda. La región señalada corresponde a la región 1700- 900 cm^{-1} la cual refleja los componentes químicos principales de la larva, es decir, su huella digital.

7.7 Espectros FTIR/HATR de músculos de cerdo infectado y no infectado con *T. spiralis*.

Se obtuvieron muestras a partir de los músculos del lomo, costilla y pierna de cerdos infectados y cerdo no infectado para exponerlas a la espectroscopia de infrarrojo y determinar la factibilidad de éste para identificar la larva de *T. spiralis*. Las muestras se molieron, después se homogeneizaron. Luego, se empleó el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR). Los espectros se registraron a una resolución de 4cm^{-1} en el intervalo de 4000 a 650cm^{-1} con 64 barridos.

Los espectros FTIR-ATR de los músculos muestran picos que dependen de los enlaces moleculares y los grupos funcionales que están presentes en la muestra, por lo tanto, todos los músculos tienen una "huella digital" en función de su composición química.

Todos los espectros muestran bandas características de la presencia de proteínas, ácidos grasos y el glucógeno. La primera banda ($3600-3200\text{ cm}^{-1}$) se debe a la presencia de la vibración de grupos OH de agua, los dos picos a $2950-2850\text{ cm}^{-1}$ corresponden a enlaces CH con estiramiento de los grupos metilo y metileno. La pequeña banda a 1740 cm^{-1} se atribuye a la presencia de grupos funcionales de triglicéridos 

En la región seleccionada $1700-900\text{ cm}^{-1}$ se pueden observar las bandas características de proteínas amida I (1632 cm^{-1} , C=O) y de amida II (1547 cm^{-1}). La pequeña banda en 1396 cm^{-1} se debe a COO⁻ correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los ácidos grasos y proteínas. Por último, los grupos pequeños en la región de $1200-900\text{ cm}^{-1}$ se atribuyen a los hidratos de carbono tales como el glucógeno.

La figura 21 muestra la comparación entre los espectros de muestras de músculos de cerdos infectados y no infectados en donde puede observarse que no hay bandas nuevas evidentes que reflejen una diferencia entre cada uno de ellos. No obstante, existen claras diferencias en los valores de absorción correspondientes a la región de $1700 - 900\text{ cm}^{-1}$ la cual es el área de nuestro interés. De acuerdo a la composición bioquímica de la LM que incluye proteínas, glucosa, trehalosa y glucógeno, el incremento en absorbancia de las bandas en la región considerada fue atribuido a la presencia de las larvas en la carne de cerdo.









Figura 21. FTIR-HATR espectros de los diferentes músculos de cerdos infectados y no infectados con *T. spiralis*. Se muestra la absorbancia en función de la longitud de onda de a) costilla, b) lomo, c) pierna d) masetero. Todos evaluados en la región de 1700-900 cm^{-1} . Donde el incremento en la absorbancia de las bandas se asocia a la presencia de las larvas del parásito. Se pueden observar las bandas de 1632 cm^{-1} que indican proteínas amida I y de amida II en 1547 cm^{-1} . La banda en 1396 cm^{-1} se debe a los ácidos grasos y proteínas. Los grupos en la región de 1200-900 cm^{-1} se atribuyen a los hidratos de carbono tales como el glucógeno.

7.8 Espectros obtenidos por FTIR/HATR de salchicha y jamón derivados de cerdo infectado y no infectado con *T. spiralis*.

Para demostrar la factibilidad de detección por medio de espectroscopia de infrarrojo en la identificación de *T. spiralis* presente en derivados cárnicos, se tomaron muestras de 1 g de salchicha y jamón elaboradas a partir de la carne de cerdo infectado y no infectado. Y se expusieron en el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR). Los espectros se registraron a una resolución de 4cm^{-1} en el intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} con 64 barridos, con el software Spectrum versión 3.01.00 (Perkin Elmer, Inc.).

En las Figuras 22 y 23 se muestran los espectros de FTIR-HATR de las muestras de jamón y salchicha, ambos evaluados en la región $1700\text{-}1900\text{ cm}^{-1}$, donde se aprecian las principales diferencias entre los valores de los picos de los espectros.



Figura 22. Espectros obtenidos por FTIR-HATR de jamón de cerdos infectados y no infectado con *T. spiralis*. Se muestra la absorbancia en función de la longitud de onda del jamón. La banda 3600-3200 cm^{-1} corresponde a la vibración de grupos OH de agua, los dos picos a 2950-2850 cm^{-1} pertenece a enlaces CH. La pequeña banda a 1740 cm^{-1} se puede atribuir a la presencia de grupos funcionales de triglicéridos. La región seleccionada 1700-900 cm^{-1} manifiesta la mayor variabilidad entre las bandas de absorción y corresponde a la “huella digital” del parásito lo que permite una discriminación entre jamón con larvas de *Trichinella* y el mismo producto pero sin presencia de ellas. En esa región se observan las bandas de proteínas amida I (1632 cm^{-1} , C=O) y de amida II (1547 cm^{-1}). La pequeña banda en 1396 cm^{-1} se debe a COO- correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los ácidos grasos y proteínas. En la región de 1200-900 cm^{-1} se atribuyen a los hidratos de carbono tales como el glucógeno. En color rojo se muestra jamón con LM del parásito y en azul jamón sin LM.

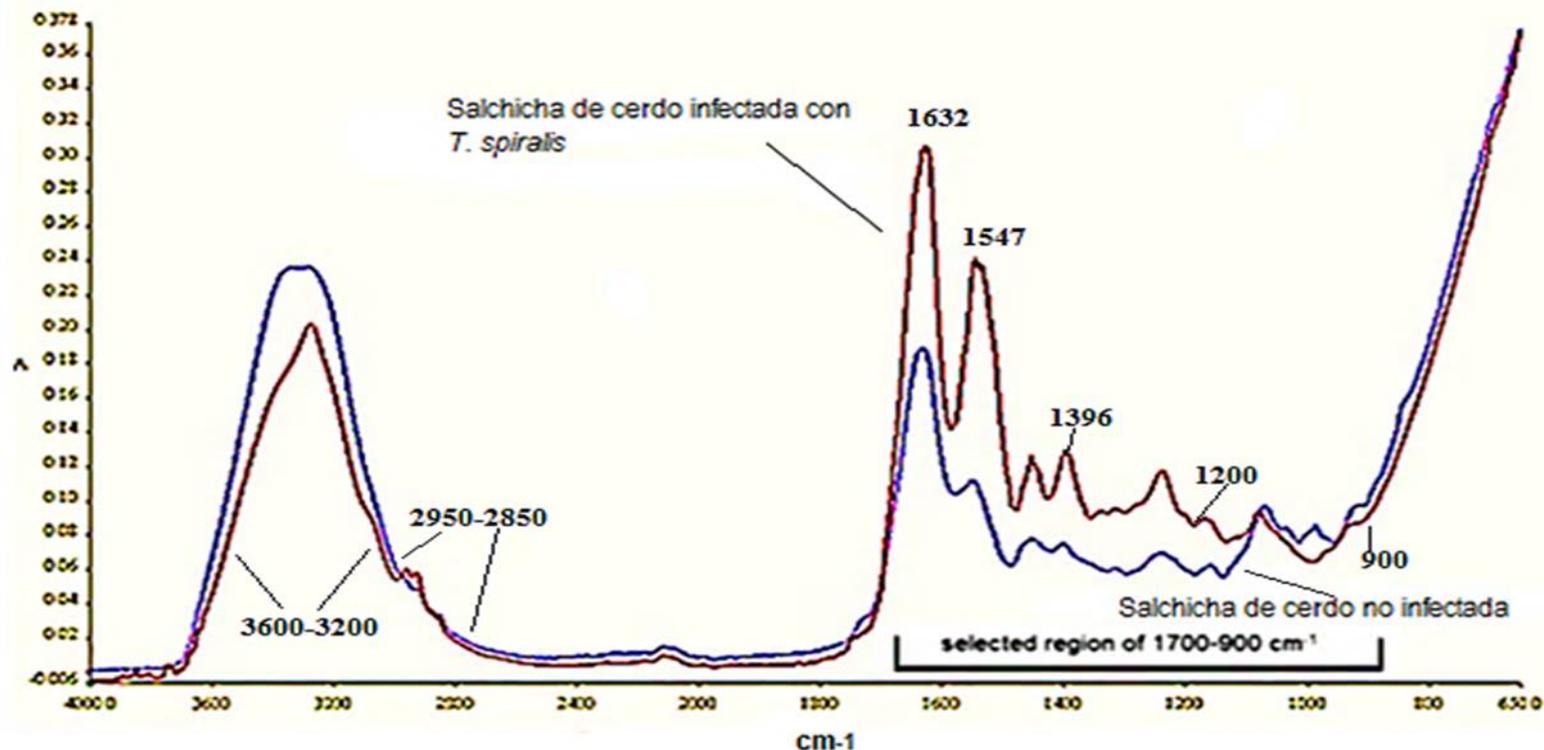


Figura 23. Espectros obtenidos por FTIR-HATR de salchicha de cerdos infectados y no infectado con *T. spiralis*. Se muestra la absorbancia en función de la longitud de onda de la salchicha, en donde la banda 3600-3200 cm^{-1} corresponde a la vibración de grupos OH de agua, los dos picos a 2950-2850 cm^{-1} pertenece a enlaces CH. La pequeña banda a 1740 cm^{-1} se puede atribuir a la presencia de grupos funcionales de triglicéridos. Se evaluó la región 1700-900 cm^{-1} la cual manifiesta la mayor variabilidad entre las bandas de absorción y corresponde a la “huella digital” del parásito lo que permite una discriminación entre salchicha con larvas de *Trichinella*, que se visualiza de color rojo y sin presencia de ellas correspondiente al espectro de color azul. En esa región se observan las bandas de proteínas amida I (1632 cm^{-1} , C=O) y de amida II (1547 cm^{-1}). La pequeña banda en 1396 cm^{-1} se debe a COO⁻ correspondiente a las vibraciones de estiramiento de los ácidos grasos y proteínas. En la región de 1200-900 cm^{-1} se atribuyen a los hidratos de carbono tales como el glucógeno.

De igual manera que los espectros obtenidos en la carne de cerdo, los espectros FTIR-HART de los derivados cárnicos expresan una huella digital dependientes de los enlaces moleculares y grupos funcionales.

7.9 Tinción de Hemalumbre de Mayer en salchicha y jamón

Se emplearon grupos por triplicado de 1g integrados con cortes de 0.1 mm de grosor de cada jamón y de salchicha para ser empleados en el tren de tinción con el colorante Hemalumbre de Mayer. En este caso, para fines cuantitativos el tren de tinción con el colorante de Hemalumbre de Mayer al ser aplicado a los derivados cárnicos, permitió la visualización de las LM de *Trichinella spiralis*, de tal manera que los ingredientes, tales como la grasa y la fécula principalmente ya no interfirieron con una precisa cuantificación de las larvas como puede notarse en las Figura 24 correspondiente a preparaciones de jamón y Figura 25 a las preparaciones de salchicha. Incluso permitió apreciar la estructura morfológica del parásito, lo que establece que el procedimiento de elaboración no tiene efecto alguno sobre la morfología.

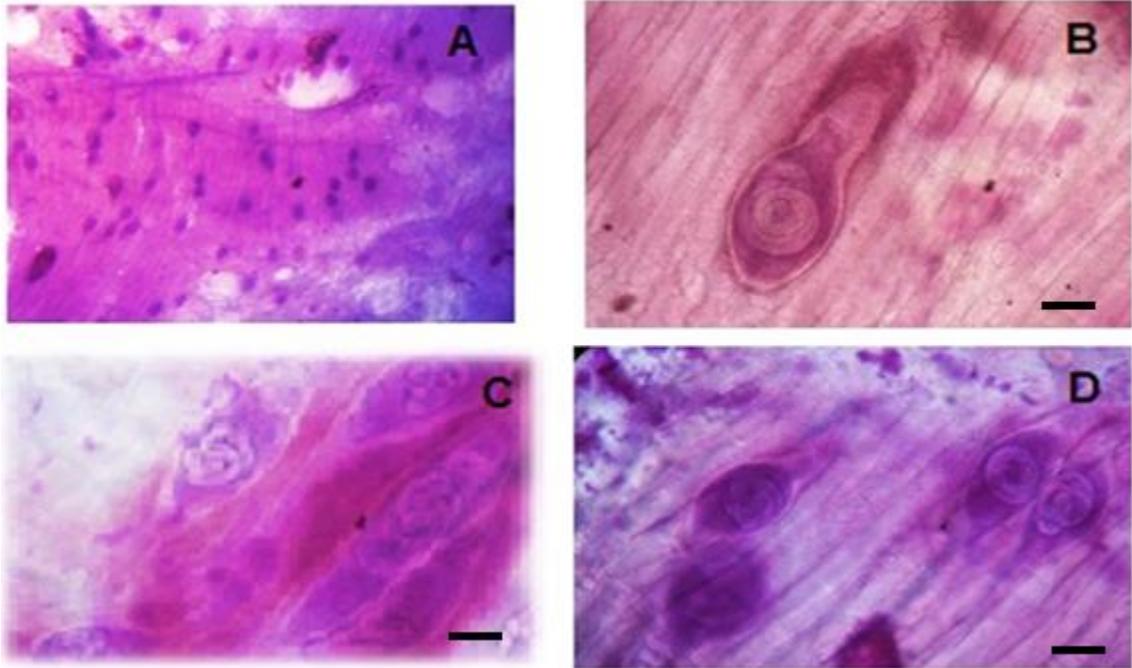


Figura 24. LM de *T. spiralis* en corte de jamón. Vista 4x. (A); Vista 10x (B) (C) (D). Se observan larvas encapsuladas en preparaciones a partir de cortes de jamón teñidas con Hemalumbre de Mayer. La barra mide 100 µm

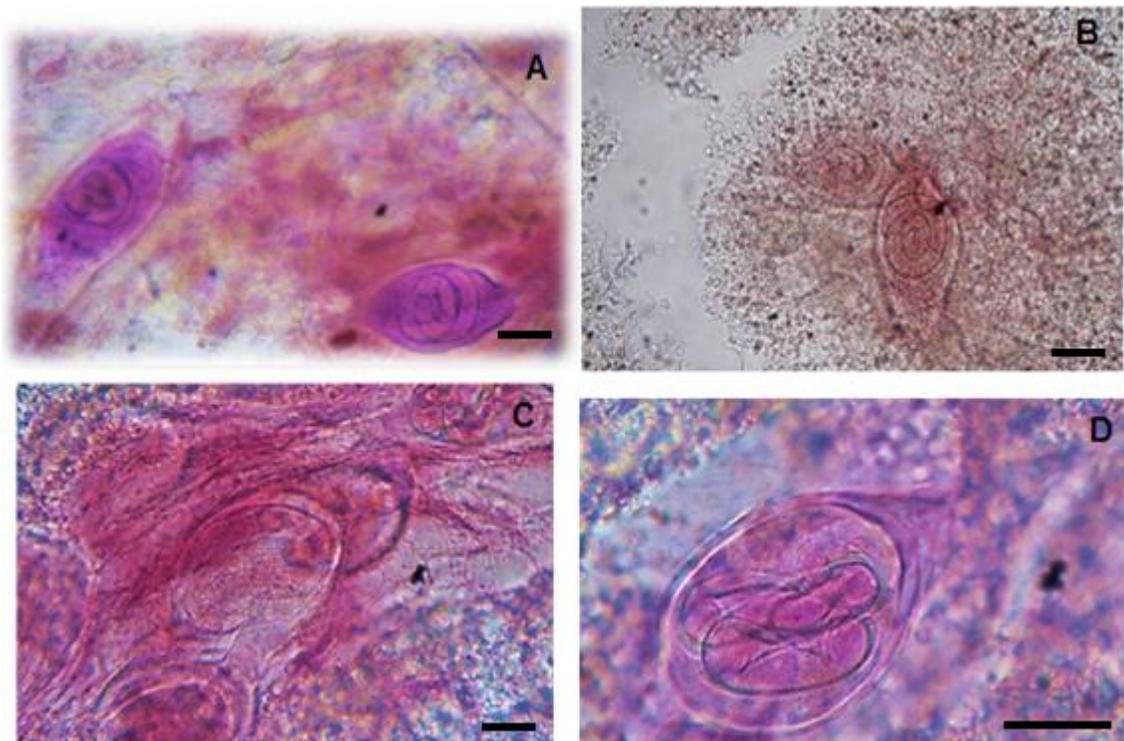


Figura 25. LM de *T. spiralis* en cortes de salchicha. Vista 10x. (A) (B); Vista 40x (C) (D). Se observan larvas encapsuladas en preparaciones a partir de cortes de salchicha teñidas con hemalumbre de Mayer. La barra de referencia en el ángulo inferior derecho mide 100 µm

7.10 Carga parasitaria en salchicha y jamón.

A partir de las preparaciones obtenidas, se realizó la cuantificación de LM de *T. spiralis* presentes en salchicha y jamón por microscopio óptico y con ello, determinar la concentración larvaria en una cantidad conocida. Los datos recabados se exponen en la Figura 26 como un comparativo entre ambos productos, en todos los casos se ve una mayor concentración en el jamón lo cual tendría relación con la región muscular empleada (pierna) para su elaboración, sin embargo los datos en conjunto mantienen que la carga parasitaria no es dosis dependiente.

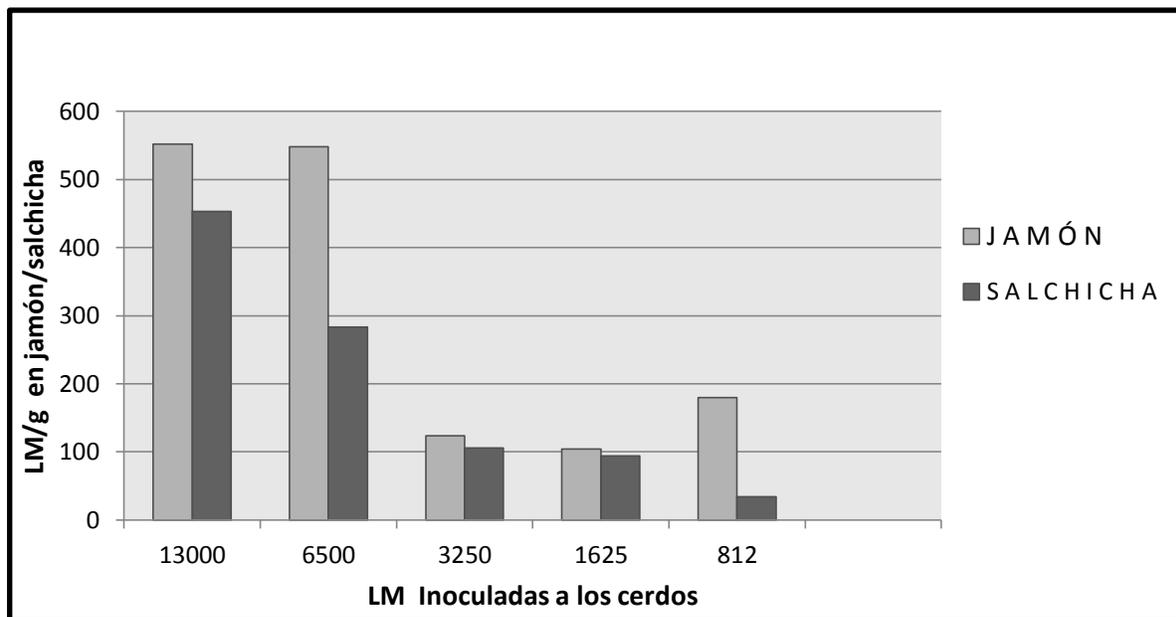


Figura 26. Número de larvas en salchicha y jamón obtenidos de animales inoculados. Se observa la distribución promedio de las LM de *Trichinella spiralis* presentes en un gramo de producto terminado tanto de jamón como de salchicha en relación a las larvas usadas para infectar.

7.11 Evaluación de la infectividad de *T. spiralis* en ratones cepa CD1.

Las pruebas realizadas para comprobar la infectividad de las LM de salchicha y jamón en ratones cepa CD1 inoculados con 50 LM cada uno, fueron las técnicas de triquinoscopía y digestión enzimática. Obteniéndose resultados negativos en ambas pruebas. Lo que comprobó la influencia de los procesos de elaboración adoptados sobre la capacidad infectiva de la larva.

8. DISCUSIÓN

8.1 Infección en cerdos y progreso de la infección

Para la realización de este trabajo se empleó como modelo experimental el cerdo, considerado como la principal fuente para el desarrollo de la triquinelosis en el ser humano, es decir como una causa de zoonosis. Por ello los trabajos experimentales enfocados a determinar la eficacia en los métodos serológicos para el diagnóstico son diversos.

La técnica de ELISA es el método más común para la detección de *Trichinella spiralis* aplicado tanto en animales como en humanos ya que es calificada como económica, fiable, de fácil estandarización y que proporciona un equilibrio aceptable de sensibilidad y especificidad (Ruiz y Martínez, 2007; Gamble *et al.*, 2004). Se ha demostrado, que el rango de sensibilidad del ELISA usando los antígenos E-S oscila entre 93.1 y 99.2%, mientras que la especificidad varía de 90.6 a 99.4% (Gamble *et al.*, 2004; Gottstein *et al.*, 2009; Nöckler *et al.*, 2009; Van der Leek *et al.*, 1992); en combinación con la técnica de Western blot, puede confirmar muestras positivas o excluir resultados falsos positivos (Moskwa *et al.*, 2009; Malandrini, *et al.*, 2010). Considerando lo anterior, cinco cerdos fueron experimentalmente inoculados vía oral con dosis de 13,000; 6500; 3500; 1625; 812 larvas/cerdo que son dosis catalogadas de moderada a muy alta como lo menciona Ricibich *et al.*, 2000. Los sueros obtenidos fueron procesados según la metodología estandarizada dentro del laboratorio y similar a la empleada por Gómez *et al.*, 2009, donde, de igual forma se utilizaron los antígenos de excreción–secreción de lo cual depende la elevada sensibilidad y especificidad de la prueba que impide la presentación de falsos positivos (Hassan *et al.*, 2010); este tipo de antígenos son capaces de inducir una fuerte respuesta humoral que implica la generación de anticuerpos específicos contra β - tivelosa , un azúcar que parece ser exclusivo de los parásitos de la familia Trichinelloidea (Bolás y Del Corral, 2006).

Los resultados obtenidos, observados en la Figura 17 que hacen referencia a la determinación por ELISA de anticuerpos en suero de cerdos infectados con diferentes cargas parasitarias, coinciden con los reportados por otros autores, que indican una respuesta basada en anticuerpos después de 21 dpi que se mantiene o aumenta hasta por 130 semanas después de la infección (Kapel y Gamble, 2000; Nöckler *et al.*, 2000; Ricibich *et al.*, 2000). Asimismo, los resultados indican que la concentración de larvas no tuvo ningún efecto sobre la cantidad de los anticuerpos producidos, sin embargo, Nöckler *et al.*, 2000 mencionan, que el tiempo de seroconversión está relacionado con la dosis de infección ya que reporta en cerdos experimentalmente infectados con 100, 500 y 2500 larvas de *T. spiralis* por animal una seroconversión a 5-7, 4-5 ó 4 semanas pi, respectivamente y si bien, la cantidad de larvas inoculadas puede influir en la aparición más temprana de anticuerpos, al igual que la persistencia, dependen de varios factores que pueden incluir la actividad del antígeno, diferencias en la respuesta inmune individual, presencia de anticuerpos maternos y síndromes de inmunodeficiencia. Además, se involucra la metodología de la técnica, el tipo de antígeno utilizado y la variabilidad del fenómeno estudiado (Gamito *et al.*, 2011; Nöckler *et al.*, 2000; Nöckler *et al.*, 2005).

Y si bien, el ELISA presenta una mayor sensibilidad que la técnica de digestión artificial, es inadecuada para el propósito de la inspección cárnica porque de acuerdo con la Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT), así como, la legislación práctica de organismos gubernamentales, no cumple con las normas exigidas para la protección de la salud pública. Para el ELISA, y para cualquier prueba serológica, se debe realizar una validación independiente utilizando sueros de animales o humanos infectados y libres de *Trichinella* representantes de la población local en la que se emplea la prueba. A su vez, se debe considerar que su sensibilidad y especificidad son altamente dependientes de la calidad del antígeno utilizado en el ensayo, de las pautas específicas para la generación de antígenos e incluso de la especie de hospedador. Además, de que pueden presentarse falsos negativos derivados de respuestas humorales tardías que pueden observarse en infecciones leves o por respuestas deficientes del

hospedador, conjuntamente la aplicación de ésta es limitada a laboratorios con una infraestructura más compleja que se convierte en una limitante para manejarla como un procedimiento rutinario (Gajadhar, *et al.*, 2009; Gamble *et al.*, 2004; Malandrini, *et al.*, 2010; Moskwa *et al.*, 2009; Nöckler *et al.*, 2000; Riva *et al.*, 2007). En adición, la presencia de anticuerpos es indicativa de contacto con el parásito pero no precisa una infección activa.

8.2 Derivados cárnicos (salchicha y jamón) a partir de la carne obtenida de cerdos infectados experimentalmente

La carne constituye actualmente un componente importante, aunque debido a condiciones económicas, no muy accesible en las dietas regulares de la mayoría de los integrantes de la población. La elaboración de embutidos busca la conservación de la carne a través de ciertos procesos de transformación que implican parámetros como la temperatura, humedad relativa y el tiempo de exposición a las variables físicas. No se pueden buscar las mismas características de calidad en una carne que va a ser consumida después de cocinarse, que en otra cuyo destino es elaborar embutidos. Datos de la producción de embutidos en México, con la finalidad de establecer aquellos de mayor demanda, destacan que las salchichas y los jamones constituyen más del 80% del total de la producción (Pulla, 2010; SECOFI, 2000; Secretaría de Economía, 2009).

Los embutidos son derivados cárnicos caracterizados por la preparación de una masa que puede tener como base carne, grasa de cerdo, vísceras y condimentos. La masa cárnica es embutida en envolturas (tripas) naturales o artificiales para proporcionar forma, aumentar la consistencia y para que se pueda someter el embutido a tratamientos posteriores (Pulla, 2010).

En este trabajo, la salchicha y el jamón se elaboraron a partir de carne de cerdos infectados con *Trichinella spiralis* y si bien, las operaciones de elaboración mantienen diferencias de acuerdo a la calidad, composición de la materia prima, y en las técnicas de elaboración, los embutidos mostrados en la Figura 19, fueron

elaborados con los ingredientes indicados en los Cuadros 4 y 5. Y con procesos similares a los descritos en manuales de productos cárnicos (Apango, 2007; Pulla, 2010; Secretaría de Economía, 2009). En general, se pretende con estos procedimientos, a través de la formulación, obtener un buen producto a mínimo costo, en el jamón se catalogan rendimientos desde el 10 hasta el 100%, siendo un jamón extrafino aquel con un rendimiento del 10-25%; un jamón popular con rendimiento del más del 100%; un jamón preferente del 45-65% donde se cataloga el producto obtenido en el presente trabajo (Secretaría de Economía, 2009).

El consumo de alimentos elaborados a base de carne de cerdo cruda o semicocinada en forma de embutidos puede resultar en una triquinosis, cuya incidencia está relacionada a la ingesta de animales no inspeccionados, deficiencias en las industrias de alimentos y a la inadecuada educación de los consumidores en materia alimentaria. En nuestro país, de acuerdo a la regulación mexicana, NOM-194-SSA1-2004, productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos, la carne de cerdo deberá ser libre de *Trichinella spiralis* (Claver, *et al.*, 2000; FAO, *et al.*, 2012; Medina, 2007).

Para efectos de este trabajo, fueron empleadas en principio las técnicas de triquinoscopia y digestión artificial para determinar la presencia de LM en salchicha y jamón, sin embargo la identificación larvaria no fue posible, debido a las características estructurales de ambos productos terminados. Los ingredientes, como la fécula y grasa así como la pérdida de integridad de las fibras musculares por los procesos de cocción y conservación (González, *et al.*, 2009), fueron los principales obstáculos para la identificación larvaria. La tinción de hemalumbre de Mayer mostró las estructuras larvarias completas lo cual indicó la posible viabilidad de las LM y su capacidad de resistencia a los tratamientos sometidos durante el procesamiento de los derivados.

El proceso de curado aplicado sólo en la elaboración del jamón, implica la interacción de sal, temperatura extrema y tiempos de secado para alcanzar una

humedad relativa entre 70 - 75% mínimo y 85 – 90% máximo (Gamble y Hill, 2000; Arnau y Monfort, 1998). Los trabajos de Medina (2007); Appleyard y Gajadhar (2000) y de Gamble y Hill, (2000), establecen que el curado no altera la viabilidad de los parásitos ni sus características físicas ya que no se han demostrado parámetros que se correlacionen con la inactivación de los mismos. Además, tanto en jamón como en salchicha, también se aplicó un proceso de cocción, donde Feldman, *et al.* (2002), mencionan una constante de 75°C, mientras que Pulla (2010), sugiere una temperatura de 80°C en un tiempo de 30 a 150 minutos dependiendo del diámetro del embutido. Éstas constantes coinciden con las recomendadas para inactivar las larvas de *Trichinella spiralis* las cuales oscilan desde los 54°C hasta los 77°C según lo reportado por la FAO (2013) y Appleyard y Gajadhar, 2000. Sin embargo, no hacen mención en cuanto a la resistencia de las estructuras larvarias, las cuales se observaron íntegras aún a pesar de alcanzar una temperatura constante de 80°C y 72°C para jamón y salchicha, respectivamente. Seguido de una conservación en refrigeración a 4°C, temperatura que refiere Medina (2008), sólo conlleva a una disminución parcial en la capacidad reproductiva de *Trichinella* cuando se mantiene por más de tres meses.

8.3 Espectros MID-FTIR de salchicha y jamón. Factibilidad del método para detectar la presencia de *T. spiralis* en los derivados cárnicos de cerdo

La industria de procesamiento de la carne y de los alimentos es una de las más grandes en el mundo y la espectroscopia de infrarrojo (IR) desempeña un papel importante en el mantenimiento consistente de la calidad del producto, ya que dentro de sus aplicaciones se incluyen el estudio de las interacciones de los componentes de los alimentos, la cuantificación de nutrientes y otros compuestos específicos, la caracterización estructural de las moléculas de los alimentos, la determinación de la calidad de materias primas y aditivos, así como detectar la adulteración o autenticidad de los alimentos (Reddy y Proctor, 2009).

El infrarrojo medio ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) es la región más comúnmente utilizada para el análisis, puesto que todas las moléculas poseen frecuencias de absorción características y vibraciones moleculares en este rango. La espectroscopia de infrarrojo medio se basa en el estudio de la interacción entre la radiación de infrarrojos con una muestra, donde las longitudes de onda específicas son absorbidas haciendo que los enlaces químicos se sometan a diversos tipos de vibraciones. Por lo tanto existe una correlación entre posiciones de las bandas de IR y las estructuras químicas en la molécula. En consecuencia, el espectro de un compuesto, en este caso los componentes de los parásitos en estado larvario, contienen una gran cantidad de información estructural, la cual es considerada como su "huella digital". Además de proporcionar información cualitativa sobre los grupos funcionales, los espectros de IR pueden proporcionar información cuantitativa (Davis y Mauer, 2010; van de Voort, 1992; Piqué y Vázquez, 2012; Schulz *et al.*, 1993).

En este trabajo se empleó la técnica de espectroscopía de infrarrojo medio por transformada de Fourier (FTIR), con reflectancia total atenuada horizontal (HATR), calificada en su conjunto como una técnica no invasiva, no destructiva y rápida (Gangidi *et al.*, 2003; Ruoff *et al.*, 2006; Papadopoulou, 2011). En particular la Transformada de Fourier ofrece una relación señal/ruido mucho mejor y mayor rapidez en la obtención de espectros y al combinarlo con la tecnología HATR otorga el potencial de hacer un análisis cuantitativo (Serrano, 2007; van de Voort, 1992). En los últimos años ha aumentado el uso de FTIR en la caracterización de organismos, no obstante, la mayoría de las investigaciones están dirigidas hacia la discriminación, clasificación e identificación de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras (Davis y Mauer, 2010; Mariey *et al.*, 2001).

Los valores espectrales detectados en los análisis practicados a las diferentes muestras de jamón y salchichas elaborados con carne de cerdos infectados con larvas de *T. spiralis* estudiados en el intervalo de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ coincidieron con los valores detectados por Gómez de Anda *et al.*, 2012, específicamente la región de $1700\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ que corresponde con los componentes corporales de las LM

(composición proteica y de carbohidratos). Este patrón se encontró en todas las piezas de carne que se estudiaron (Figura 21) incluidas: costilla, lomo y pierna en donde los componentes del estadio larvario se pueden diferenciar de todos los demás grupos bioquímicos funcionales como el agua, lípidos, proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos propios de los componentes musculares.

La aplicación de MID-FTIR-HART en los derivados cárnicos ha sido estudiada previamente por De Voort, 1992 quien ha empleado el proceso en emulsiones de salchicha que ha sido propuesto para seguir los estándares de formulación de estos productos que coincidieron con los valores observados tanto en los productos obtenidos de los animales infectados como con los no infectados por lo que los espectros obtenidos demuestran la utilidad de esta técnica para usarse como un procedimiento de discriminación entre derivado cárnico infectado y otro no infectado.

8.4 Tinción de hemalumbre de Meyer para facilitar la cuantificación de LM de *Trichinella spiralis* presentes en salchicha y jamón

El colorante de hemalumbre de Mayer se emplea como un método de contraste nuclear en citología e histología. Está clasificado como colorante progresivo, lo que le confiere una concentración de colorante más baja y tiñe la cromatina nuclear de manera selectiva, sin teñir las estructuras citoplasmáticas (Labonord, 2012). En el área de Parasitología esta tinción es empleada para el procesamiento de ejemplares de helmintos de todos los grupos para elaborar preparaciones con montaje fijo, lo cual permite una observación clara y precisa de las estructuras que ayudan a la identificación morfológica de los parásitos, así como la posibilidad de constituir un archivo permanente de los mismos (Salazar, 1980)

Al usar un agente oxidante, la hematoxilina es transformada en hemateína debido a una reacción química. La hemateína es el colorante que, combinado con un mordiente (alumbre), forma compuestos complejos que se usan en medio ácido y

confieren una coloración con un tono azul/violeta al realizar el lavado con agua (Labonord, 2012; Merck, 2012).

La tinción de hemalumbre de Mayer permitió la observación de las larvas musculares de *Trichinella spiralis* a partir de cortes de 0.1 mm de grosor provenientes tanto de salchicha como de jamón, cuyos componentes como la fécula, grasa y la consistencia misma dificultaban la identificación de la larva por la técnica de triquinoscopía y digestión enzimática. Por ello se optó por una técnica de tinción. Sin embargo no hay referencias en cuanto a la aplicación de esta tinción en productos cárnicos; el tren fue estandarizado durante el proceso y en base a protocolos propios del laboratorio de Parasitología. Como resultado, las células nodrizas que contenían las larvas fueron fácilmente visualizadas como estructuras ovales de color violeta-rojizo intenso, mostradas en las Figuras 24 y 25. Estos resultados son comparables a los reportados por Ramírez *et al.*, 2007, cuyo trabajo fue dirigido a la fácil detección de la larva muscular de *T. spiralis* empleando la tinción de Giemsa en muestras musculares, en donde a la observación por microscopio óptico, la célula nodriza es mostrada de color azul, en contraste con las células musculares de color rosa. Señalado como un contraste similar al obtenido en cortes histológicos teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Ramírez, 2012).

El contraste se pudo lograr en el momento en que las muestras fueron sometidas a un tratamiento ácido justo después del paso de tinción, de lo contrario, el exceso de colorante no se hubiera eliminado durante la fase de deshidratación y el contraste se hubiera perdido (Ramírez *et al.*, 2007).

Además la exposición a éter, sustancia con propiedades como solvente de grasas fue de utilidad para permitir la fijación del colorante en los cortes de salchicha específicamente considerando que la grasa correspondía a un tercio de la composición del producto.

Gracias a la fácil visualización de las larvas, la cuantificación fue lograda satisfactoriamente obteniéndose el promedio de larvas recuperadas por

producto/cerdo de procedencia. La Figura 26 (número de larvas cuantificadas en salchicha y jamón) demuestra que la carga parasitaria no es dosis dependiente, ya que el promedio de larvas recuperadas, depende de varios factores -como puede ser el número de hembras establecidas, su fecundidad, su vida reproductiva y la supervivencia de las larvas musculares-, cabe mencionar que el grado de respuesta por parte del hospedador tiene influencia diferencial en cada uno de los factores (Wakelin y Goyal, 1996). Sumado a ello es de considerar en este caso, la influencia otorgada por los componentes de la formulación de salchicha y jamón que pudieron haber influido en la cantidad de larvas presentes en cada corte procesado.

8.6 Infectividad de LM de *Trichinella spiralis* presentes en salchicha y jamón.

En ciertas zonas del país han surgido brotes de triquinelosis, cuya causa ha sido la ingestión de chorizo y carne de cerdo recién procesados (Hil *et al.*, 2007; Quiroz y Landeros, 1988; Olivares, 1987); los trabajos existentes en derivados cárnicos de cerdo están dirigidos a valorar la sobrevivencia de las LM de *T. spiralis* en chorizo donde las condiciones microambientales producidas durante el procesado de la carne favorecen la persistencia de larvas infectivas en el producto obtenido por lo menos durante los primeros 15 días de maduración.

Como parte de este trabajo, una cantidad conocida de salchicha y jamón elaborados a partir de carne de cerdo con LM de *Trichinella spiralis* fue proporcionada vía oral a ratones cepa CD1 y transcurridos 30 dpi se les realizó eutanasia, para realizar las pruebas de triquinoscopia y digestión enzimática como lo establece la NOM-194-ZOO-SSA1-2004, productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos, obteniéndose un resultado negativo en ambas pruebas. Esto determinó que en el caso del jamón, nuestro resultado concuerda con lo obtenido por Rouse, (1979) quien utilizó carne de rata infectada

con *T. spiralis* para la producción de este mismo embutido e indicó que la preparación correcta de un jamón descarta la capacidad infectiva del nematodo. Concordando a su vez con lo descrito por Quiroz y Landeros, 1988; Vega 1991; Tay *et al.*, 2004. Teniendo efecto sobre nuestros resultados en la elaboración de las salchichas.

De acuerdo a lo anterior, los procesos en el procedimiento de elaboración de los embutidos son determinantes para la inactivación del parásito. En el caso de la cocción, se han establecido ciertos parámetros para lograr inactivar la LM de *Trichinella*: de 47 minutos a 52°C; 6 minutos a 55°C o por un minuto a 60°C. Estos tiempos y temperaturas sólo aplican cuando el producto las alcanza y mantiene la temperatura uniformemente. Datos similares son mostrados por el código de regulaciones federales de Estados Unidos de los productos de carne procesada, que indica se requieren 2h a 52.2°C; 15 minutos a 55.6°C y durante un minuto a 60°C. Las constantes referidas sustentan los resultados obtenidos ya que al mantener la temperatura invariable y uniforme de 72°C por 20 minutos en salchicha y 80°C por 50 minutos en jamón influyó en la pérdida de infectividad de las LM (Appleyard y Gajadhar, 2000; Gamble, 1997; Gamble, 2000). No obstante, habrá de tenerse en cuenta los requerimientos térmicos para tener un producto “libre” de *Trichinella spiralis* en consideración a las diferencias espaciales y entre especies, ya que como lo describen Randazzo *et al.* (2011), éstos aspectos podrían actuar como factores de confusión que, al ser ignorados, llevarían a la utilización de tratamientos térmicos eficientes para determinadas cepas de *T. spiralis* pero ineficientes para otras.

9. CONCLUSIONES

La técnica de espectroscopia de infrarrojo medio por la transformada de Fourier por reflectancia total atenuada horizontal (MID-FTIR-HATR) permite detectar y discriminar exitosamente entre los dos productos terminados: salchicha y jamón infectados con larvas musculares de *Trichinella spiralis* y productos control. Determinándose que este método está calificado para ser aplicado en distintas carnes y productos procesados de importancia comercial y que son susceptibles de estar infectados con este parásito. Incluso, su aplicación se extiende a la detección de otros organismos parásitos, estableciendo los estándares adecuados. Entre las ventajas, respecto a las técnicas convencionales se consideran, la reducida cantidad que se emplea, la posibilidad del procesamiento sin realizar preparación previa; se trata de una prueba en la que el procesamiento se realiza rápidamente y no necesita reactivos por lo que le confiere la propiedad de ser amable con el ambiente.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara P, De la Rosa JL, Correa MD. Triquinelosis: Una Parasitosis Fuera de Serie. México: INDRE, 1992.
2. Al-Jowder O, Kemsley E, Wilson R. Detection of adulteration in cooked meat products by mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 1325-1329.
3. Apango A. Ficha técnica. Elaboración de productos cárnicos. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca Y Alimentación (SAGARPA) 2007; 1-8.
4. Appleyard G, Gajadhar A. A Review of Trichinellosis in People and Wildlife in Canada. *Can. J. of Pub. H.*, 2000; 91(4): 293-297.
5. Arnau J, Monfort J.M. El jamón curado: Tecnología y análisis de consumo. Simposio especial 44th International Congress of Meat Science and Technology. Barcelona: Estrategias Alimentarias S.L. EUROCARNE, 1998:10 -16.
6. Arriaga C, Yopez L, Ortega G. Avances y perspectivas en el diagnóstico de la Triquinelosis porcina. *Ciencia Veterinaria* 1994; 6: 73-99.
7. Ashour D, Elbakary R. Pathogenesis of restricted movements in trichinellosis: An experimental study. *Experimental Parasitol.* 2011; 128: 414-418.
8. Beck W, Pantchev N. Zoonosis parasitarias. 1^a ed. España: Servet editorial, 2010 pp 6-9.
9. Bendini A, Cerretani L, Di Virgilio F, Belloni P, Bonoli C.M, Lercker G. Preliminary evaluation of the application of the FTIR spectroscopy to control the geographic origin and quality of virgin olive oils. *J. of Food Quality* 2007; 30: 424-437.
10. Bertenelli D, Plessi M, Sabatini A, Lolli M, Grillenzoni F. Classification of italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). *Food Chem.* 2007; 101: 1565-1570.

11. Bessonov A, Cuperlovic K, Gajadhar A. Recommendations on Methods for the Control of *Trichinella* in Domestic and Wild Animals Intended for Human Consumption. International Commission on Trichinellosis 2000: 1-20.
12. Bolás F, Del Corral L. TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. Reserch in Veterinary Science 2006; 81:297-303.
13. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 5ª ed. Colombia: CIB (Corporación para Investigaciones Biológicas), 2012 pp 449-454.
14. Bowman D. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 9ª ed. China: Saunders Elsevier, 2009 pp 222-223.
15. Bruschi F, Chiumiento L. *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy? Parasites & Vectors 2011; 4(42): 1-6.
16. Bruschi F, Murrell K. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. Postgraduate Medical Journal 2002; 78: 15-22.
17. Builes LM, Laverde LM. Triquinelosis una zoonosis parasitaria. Revista CES. 2009; 4(2): 130-136.
18. Capó V, Despomier D. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. Clin. Microbiol. Rev. 1996; 9(1): 47-54.
19. Caracostantogolo J. Triquinelosis: transmisión experimental en ratas bajo condiciones de cautiverio (Tesis de Maestría). Argentina: Universidad Nacional de San Martín (UNSAM), 2009.
20. Castañeda V. Efecto de la inmunoterapia utilizando antígeno soluble total de *T. spiralis* en cerdos infectados con *T. spiralis* (Tesis de Maestría).Zacatecas: Universidad Autónoma de Zacatecas, 2010.
21. Claver F, Blay V, Mitre M, Suárez-Varela M, González L. Enfermedades parasitarias de origen alimentario más frecuentes en España: incidencia y comparación con las de origen vírico y bacteriano. Ars Pharmaceutica 2000; 41(3): 293 - 305.

22. Colville J, Berryhill. Handbook of zoonoses identification and prevention. 1^a ed. United States of America: Mosby Elsevier. 2007 pp 200 - 203.
23. Cordero del Campillo M, Rojo F, Martínez A, Sánchez M, Hernández S, Navarrete I, *et al.* Parasitología Veterinaria. 1^a ed. México: Mc Graw Hill Interamericana, 1999 pp 496 - 506.
24. Chávez E, Saldívar S, Muñoz J, Moreno M. Trichinellosis una zoonosis vigente. Revista electrónica de veterinaria REDVET. 2006; 7(5): 1 -19.
25. Che Man Y, Syaharariza Z, Mirghani M, Jinap S, Bakar J. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier transform infrared spectroscopy. Food Chem. 2005; 90:815 - 819.
26. Chester P, Clifton R, Wayne E. Parasitología Clínica. 2^a ed. España: Salvat, 1986 pp 239 -341.
27. Davis R, Mauer L. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. 2010: 1582 - 1594.
28. De Fuentes M, Bosch C, Sánchez F. Aplicación de la Espectroscopía de infrarrojo medio en Química Analítica de procesos. Boletín Sociedad Química de México 2008; 2(3): 93 - 103.
29. De la Rosa J, Campos R, Rivera V, Escobar A, Miliar A, Herrera N, *et al.* Comparative effects of levamisole, *Staphylococcus*, and Freund's adjuvant on rat immunization with excretory and secretory antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae. Parasitol Res 2012; 111:1599 -1605
30. De la Rosa J, Gómez A. *Trichinella* y Triquinosis. Becerril M, editor. Parasitología Médica: De las Moléculas a la Enfermedad, 1^a Ed. México: McGraw-Hill, 2004 pp 219 - 226.
31. Denkers E, Wassom D, Hayes C. Characterización of *Trichinella spiralis* antigens sharing an immunodominant, carbohydrate associated determinant distinct from phosphorylcholine. Mot. Biochem. Parasitol 1990; 41: 241- 249.

32. Despommier D. How does *Trichinella spiralis* make itself at home. Parasitol. Today 1998; 14 (8): 318 - 323.
33. Dupouy C. J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. Vet. Parasitol, 2000; 93: 191 – 200.
34. Dupouy C. J, Murrell K, Boireau P, Bruschi F, Gamble H, Pozio E, *et al.* FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), World Organization for Animal Health (OIE), 2007; 1 - 119.
35. Etzion Y, Linker R., Cogan U, Shmulevich I. Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. J. Dairy Sci. 2004; 87: 2779-2788.
36. Euzéby J. Los Parásitos de las Carnes: Epidemiología, Fisiopatología, Incidencias Zoonósicas. España: Acribia Ed, 2000 pp 172 - 225.
37. Fabre M, Beiting D, Bliss S, Appleton J. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. Vet. Parasitol. 2009; 159: 248 - 248.
38. Feldman P, Etcheverry ML, Melero M, Janin A, Asad A, Walter G, *et al.* Guía de aplicación de buenas prácticas de manufactura. Faena de cerdos y elaboración de derivados. 2002; 1-144.
39. Flisser A, Pérez R. Aprendizaje de la Parasitología Basada en Problemas. 1ª ed. México: Editores de Textos Mexicanos Ed, 2006 pp 560-570, 598,599.
40. Gajadhar A, Gamble H. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. Vet. Parasitol. 2000; 93:183-189.
41. Gajadhar A, Pozio E, Gamble H, Nöckler K, Maddox-Hyttel Ch, Forbes L, *et al.* *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Vet. Parasitol. 2009; 159: 197-205.
42. Gállego J. Manual de Parasitología, Morfología y Biología de los Parásitos de Interés Sanitario. 2ª ed. España: Ediciones Universitat de Barcelona Ed, 2003 pp 347-354.
43. Gamble H. Parasites associated with pork and pork products. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 1997; 16 (2): 496-506.

44. Gamble H, Hill D. *Trichinella*. National Pork Board 2000:1-5.
45. Gamble H, Anderson W, Graham C, Murrell. Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet. Parasitol.* 1983; 13:349-361.
46. Gamble H, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel C, Gajadhar A. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. International Commission on Trichinellosis (ICT) 2004; 1-39.
47. Gamito J, Blanco J, Suárez I, Serrano F, Pérez J. Serological detection of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in wild boar by ELISA using an excretor-secretor antigen and a crude antigen. *Ibero-Latinoam. Parasitol.* 2011; 70(1): 49-57.
48. Gangidi R, Proctor A, Pohlman F. Rapid determination of spinal cord content inground beef by attenuated total reflectance Fourier Transform infrared spectroscopy. *J. of Food Science* 2003; 68 (1): 124-127.
49. Gómez E, Blanco M, Doménech A. *Manual de Inmunología Veterinaria*. 1ª ed. España: Pearson Prentice Hall Ed, 2007 pp 457-461.
50. Gómez de Anda F. Factibilidad de detección de *Trichinella spiralis* en carne por clasificación de analogía espectral (SIMCA) (Tesis de Doctorado) México: Instituto Politécnico Nacional. 2012.
51. Gómez de Anda F, Dorantes L, Gallardo T, Osorio G, Calderón G, Martínez L, De la Rosa J.. Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using Mid-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA). *Meat Science* 2012; 91: 240-246.
52. Gómez de Anda F, Gallardo T, Osorio G, Dorantes L, Calderon G, Noguera B, De la Rosa J. Feasibility study for the detection of *Trichinella spiralis* in a murine model using mid-Fourier transform infrared spectroscopy (MID-FTIR) with attenuated total reflectance (ATR) and soft independent modelling of class analogies (SIMCA). *Vet. Parasitol.* 2012; 19: 496-503.

53. Gómez M, Ludovisi A, Pezzotti P, Amati M, Cherchi S, Lalle M, Pecoraro F, Pozio E. International ring trial to detect anti-*Trichinella* IgG by ELISA on pig sera. *Vet. Parasitol.* 2009; 166: 241-248.
54. González M, Suárez H, Martínez O. Análisis estructural de la carne de jamón durante el proceso de cocción y temperatura de almacenamiento. *MVZ Córdoba.* 2009; 14(3);1803-1811.
55. Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin. Microbiol. Reviews* 2009; 22:127.
56. Gurdeniz G, Ozen B, Tokatli F. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 227: 1275-1281.
57. Hassan S, Faragalla M, El-Moghazy, Toaleb N. Comparison of two antigens for diagnosis of trichinellosis in pigs. *World Appl. Sci. J.* 2010; 8(4): 457-461.
58. Hendrix Ch. *Diagnostic Parasitology for Veterinary.* 4^a ed. España: Robinson, VT, Elsevier 2012 pp 299-300.
59. Hill D, Forbes L, Gajadhar A, Gamble H. Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue. *Vet. Parasitol.* 2007, 146: 102-106.
60. Holland J, Kemsley E, Wilson R. Use of Fourier transform infrared spectroscopy and partial least squares regression for the detection of adulteration of strawberry purees. *J. of the Science of Food and Agriculture.* 1998, 76: 263-269.
61. Jiménez E, Caballero M, Uribe G, Trejo E, Gay F. Frecuencia de *Trichinella spiralis* en sangre y músculo de equinos sacrificados en dos diferentes mataderos, uno de tipo industrial y otro de tipo rural en el Estado de México, México. *Vet. Méx.* 2005; 36(3): 269-278.
62. Kapel Ch. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet. Parasitol.* 2000; 93 (3-4): 263-278.
63. Kapel C, Gamble H. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella spp.* in experimentally infected pigs. *International J. Parasitol.* 2000; 30: 215-221.

64. Karoui R, Lefur B, Grondin Ch, Thomas E, Demeulemster C, De Baerdemaeker J, *et al.* Mid-infrared spectroscopy as a new tool for the evaluation of fish freshness. *International J. of Food Science and Technology*. 2007; 42: 57-64.
65. Kassai T. *Helmintología Veterinaria*. España: Acribia, 1998 pp 130-134.
66. Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.* 2000; 93: 365-383.
67. Labonord. Instrucciones de uso Hematoxilina de Mayer (Ficha técnica). Francia, 2012.
68. Lachenmeier D. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chem.* 2007; 101: 825-832.
69. Lamberti R, Gino L, Pombar A, Calvo C. Seminario de Trichinellosis: Técnicas de diagnóstico de la Trichinellosis. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa 2003; 1-9.
70. Lin M, Rasco B, Cavinato A, Al-Holy M. Infrared (IR) Spectroscopy Near-Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 2009; Capítulo 6: 119-143.
71. Lunney J, Murrell D. Immunogenetic Analysis of *Trichinella spiralis* Infections in Swine. *Vet. Parasitol.* 1988; 29: 179-193.
72. Malandrini J, Molina V, Soria C, Pizarro C. Detección de trichinellosis con diferentes metodologías. 2010; 5(14): 25-34.
73. Maldonado C. Evaluación del efecto protector del inmunógeno de 45 kDa en la infección por *Trichinella spiralis* en ratas nutridas y desnutridas (Tesis de Doctorado) México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2007.
74. Mariey L, Signolle J, Amiel C, Travert J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational spectroscopy*. 2001; 26: 151-159.
75. Markell E, Voge M, John T. *Parasitología Médica*. 6ª ed. España: Interamericana-McGraw Hill Ed, 1990 pp 276-279.

76. Martínez I, Gutiérrez M, Romero R, Fernández A, Vázquez O, Pérez M, Inmunoepidemiología de la triquinelosis en niños de la Ciudad de México. Rev. Mex. Patol. Clin. 2000;47 (3): 156-161.
77. Matissek R, Schnepel F, Steiner G. Análisis de Alimentos. Fundamentos, Métodos, Aplicaciones. 2ª ed. España: Acribia, 1992 pp 357-360.
78. Medina M. Determinación experimental de la viabilidad de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo sometida a diferentes condiciones de manejo y conservación (Tesis de Maestría) México: Universidad de Guadalajara, 2007.
79. Medina M, Ramírez A, Kühne M, Gómez A, De la Rosa J. Influence of different processing procedures on the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* in pork meat. Trop Anim Health Prod. 2008; 41(41): 437-442.
80. Medina M, Ramírez A, Pérez E, Pacheco C, Ruvalcaba S, Gonzalez D, Viabilidad de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo expuesta a diferentes condiciones experimentales de conservación. Memorias IX Congreso de ciencia de los alimentos y V Foro de ciencia y tecnología de alimentos. 2007; 235-242.
81. Merck. Microscopia. Hemalumbre en solución según Mayer (Ficha técnica). Alemania, 2012.
82. Merrell K.D, Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. International J. Parasitol. 2000; 30: 1339-1349.
83. Miller J, Horohov D. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep. American Society of Animal Science.2006; 84: 124-132.
84. Mitreva M, Jasmer D. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. Worm Book, ed. The *C. elegans* Research Community 2006; 1-21.
85. Montaña J. Temas Selectos de Inmunología Veterinaria. En: Hernández J, Ramírez H, editores. Características de la respuesta inmunitaria del cerdo. México: El Manual Moderno, 2005: 107-113.
86. Moreno M, Maldonado C, García E, Reveles R, Muñoz J. Fase intestinal de *Trichinella spiralis* en Modelo Murino. Acta biol. Colomb. 2009; 14(1): 203-210.

87. Moskwa J, Bien W, Cabaj K, Korinková K, Koudela J, Stefaniak J. The comparison of different ELISA procedures in detecting anti-*Trichinella* IgG in human infections. *Vet. Parasitol.* 2009; 159: 312-315.
88. Mossoba M, Yurawecz M, McDonald R. Rapid determination of the total trans-content of neat hydrogenated oils by attenuated total reflection spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996; 73: 1003-1009.
89. Murrell K, Pozio E. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *J. Parasitol.* 2000; 30: 1339-1349.
90. Nielsen S. *Análisis de los alimentos.* 1ª ed. España: Acribia, 2009 pp 455-459.
91. Norma Mexicana NMX-F-123-S-1982, Alimentos. Jamón cocido. Especificaciones Norma Mexicana. Dirección General de Normas.
92. Norma Mexicana NMX-F-065-1984, Alimentos. Salchichas. Especificaciones. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
93. Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
94. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
95. Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales.
96. Norma Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994, Proceso sanitario de la carne.
97. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
98. Nöckler K, Pozio E, Voigt W, Heidrich J. Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet. Parasitol.* 2000; 93: 335-350.

99. Nöckler K, Reckinger S, Broglia A, Mayer-Scholl A, Bahn P. Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Vet. Parasitol.* 2009; 163: 341-347.
100. Nöckler K, Serrano F, Boireau P, Kapel C, Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.* 2005; 132: 85-90.
101. Oberreuter H, Brodbeck A, Von Stetten S, Goerges S, Scherer S. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy is a promising tool for monitoring the population dynamics of microorganisms in food stuff. *Eur. Food Res. Technol.* 2003; 216: 434-439.
102. Olivares C. R., 1987. Diagnóstico de *Trichinella spiralis* en chorizo y longaniza por el método de digestión artificial en los municipios de Morelia y Paracho, Michoacán. Tesis, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.
103. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar. Argentina: FAO, MAGyP, INTA, 2012.
104. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Triquinosis. OIE. 2004; 413-420.
105. Organización Mundial de la Salud. Serie de informes técnicos. Zoonosis Parasitarias. Organización Mundial de la Salud 1979; 1-135.
106. Ortega-Pierres MG, Arriaga C, Yépez L. Epidemiology of trichinosis in México, Central and South América. *Vet Parasitol.* 2000; 98:201-225.
107. Papadopoulou O, Panagou E, Tassou C, Nychas G. Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Res. International.* 2011; 44: 3264-3271.
108. Paradkar M, Irudayaraj J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chem.* 2002; 78: 261-266.
109. Pereira A, Pérez M. Triquinosis. *Offarm.* 2001; 20(9):112-118.

110. Perkin Elmer. FT-IR Spectroscopy Attenuated Total Reflectance (ATR). Nota técnica. PerkinElmer, Inc. USA. 2005.
111. Picherot M, Oswald I, Cote M, Noeckler K, Guerhier F, Boireau P, *et al.* Swine infection with *Trichinella spiralis*: comparative analysis of the mucosal intestinal and systemic immune responses. *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 122-130.
112. Pinelli A, Acedo E, Hernández J, Belmar R, Beltrán A. Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. 2004.
113. Piqué T, Vázquez A. Uso de Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y Cemento investigación y Desarrollo* 2012; 3(2): 62-71.
114. Pozio E, Zarlenga D. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International J. Parasitol.* 2005; 1191-1204.
115. Pulla P. Embutidos crudos y cocidos (Curso: Procesos industriales III) Perú: Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, 2010.
116. Quiroz H. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de Animales Domésticos. 1ª ed. México: Limusa, 2011 pp 574-581.
117. Quiroz H, Froylan O. Enfermedades Parasitarias en Perros, 1ª ed. México: Castdel, 2006. pp 297-306.
118. Quiroz H, Landeros R. Valoración del tiempo de sobrevivencia de larvas de *Trichinella spiralis* en chorizo de cerdo. *Revista Mexicana de Parasitología.* 1988;1(1): 22-34.
119. Ramírez C, Gómez A, De la Rosa JL. Application of Giemsa stain for easy detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Korean Parasitol.* 2007; 45(1): 65-68.
120. Ramírez MC. Caracterización del infiltrado celular que rodea la célula nodriza de *Trichinella spiralis* por medio de tinciones histológicas (Tesis de Licenciatura) Fac. de Quim. Universidad Nacional Autónoma de México. México: D.F., 2012.

121. Ramírez V. Epidemiología de la Triquinelosis. *Ciencia Veterinaria* 1981; 278-297.
122. Randazzo V, La Sala L, Costamagna S. Efecto de la temperatura sobre la viabilidad de larvas de *Trichinella spiralis*. *Revista Argentina Microbiol.* 2011; 43: 256-262.
123. Reddy R, Proctor A. Meat and Meat Products. In: Sun D. editor. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Elsevier, 2009: 179-214.
124. Ribicich M, Gamble H.R, Sommerfelt, Rosa A, et al. Clinical, haematological, biochemical and economic impacts of *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Vet. Parasitol.* 2007; 147: 265-270.
125. Ricibich M, Miguez M, Franco, Basso N, Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis. *The Pig Journal* 2000; 46: 24-34.
126. Riva E, Steffan P, Fiel C. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. *Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe*, 2007 pp 94-109.
127. Rouse P. Viabilidad de *Trichinella spiralis* en jamón de rata (Tesis de Licenciatura) Fac. de Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México: D.F., 1979.
128. Ruiz M, Martínez M. Trichinellosis: Técnica Inmunoenzimática de diagnóstico (ELISA). Área de Parasitología, Instituto de Patobiología, INTA 2007; 84-87.
129. Ruoff K, Iglesias M, Luginbühl W, Bosset J, Bogdanov S, Amadò R. Quantitative analysis of physical and chemical measurands in honey by Mid-Infrared Spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol.* 2006: 79-91.
130. Schulz P, Leslie A, Rubio E. *Espectroscopia infrarroja*. 1ª ed. México: Universidad de Guajalajara Ed, 1993 pp 25-38.
131. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). *Elaboración de productos cárnicos*. 2007: 01-08.
132. Salazar P. *Manual de técnicas para el diagnóstico morfológico de las parasitosis*. 1ª ed. México: F. Mendez Cervantes Ed, 1980 pp 157-160.

133. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI). Guías Empresariales. 1ª ed. México: Limusa Ed, 2000 pp 13-80.
134. Secretaría de Economía. Embutidos. México: SE, 2009.
135. SENASICA-UNAM. Guía de buenas prácticas de diseño para establecimientos de Sacrificio TIF. 2012: 01-07.
136. Serrano L. Espectroscopia infrarroja. Fundamentos (curso: instrumentación y métodos de análisis químico). Posgrado en ingeniería en agua y el terreno. 2007: 1-35.
137. Silberstein D, Despomier D. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. J. Immunol. 1984; 132(2): 898-904.
138. Syahariza Z, Che Man Y, Selamat J, Bakar J. Detection of lard adulteration in cake formulation by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Food Chem. 2005; 92: 365-371.
139. Takahashi Y. Antigens of *Trichinella spiralis*. Parasitol. Today. 1997; 13(3): 104-106.
140. Taylor M, Coop R, Wall R. Veterinary Parasitology. 3ª ed. España: Blackwell publishing, 2007 pp 324-325.
141. Tay J, Sánchez J, Ruiz D, Calderón L, García Y, Alonso T. Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinellosis en la república mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas. Rev Fac Med UNAM 2004; 47 (3): 96-100.
142. Tay J, Velasco O, Lara R, Gutiérrez M. Parasitología Médica. 7ª ed. México: Méndez Editores, 2002 pp 375-381.
143. Taratuto A, Venturiello S. Trichinosis. Brain Pathology 1997; 663-672.
144. Urqhart G, Armour J, Duncan J, Dum A, Jennings F. Parasitología Veterinaria. España: Acribia Ed, 2001 pp 110-112.
145. Van de Voort. Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Res. International* 1992; 25: 397-403.

146. Van der Leek M, Dame J, Littell R. Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis. *J. Parasitol.* 1992, 78(5): 822-829.
147. Vega N, Triquinelosis Porcina. Memorias. Zoonosis Parasitarias. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. 1991; 191-199.
148. Venegas O, Valladares C. Clasificación de los productos cárnicos. *Alimentación y Nutrición* 1999; 13(1):63-67.
149. [Www.eq.upc.edu/es/estudios/material-docente/recursos/espectroscopia-de-infrarojo](http://www.eq.upc.edu/es/estudios/material-docente/recursos/espectroscopia-de-infrarojo).
150. Wakedonka M, Douglas P. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. Wormbook.org. 2006.
151. Wakelin D, Goyal P *Trichinella* Isolates: Parasite Variability and Host Responses. *International Journal for Parasitol.* 1996; 26(5): 471-481.
152. Wee S, Lee Ch, Joo H, Kang Y. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Trichinella spiralis* antibodies and the surveillance of selected pig breeding farms in the Republic of Korea. *The Korean Journal of Parasitol.* 2001; 39(3): 261-264.
153. Willard H, Merrit L, Dean J, Settle F. *Métodos Instrumentales de Análisis*. 1ª ed. México: Grupo Editorial Iberoamérica 1991 pp 280-300.
154. Yépez L, Hernández R, Arizmendi N, Fonseca R, Ortega G. Contributions to the study *T. spiralis* TSL-1 antigens in the host immunity. *Parasite immunol.* 2007; 29(12): 661-670.
155. Yépez L, Ortega M. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. *Microbiol.* 1994; 36: 127-138.

APÉNDICE I. Soluciones

ELISA			
Reactivo	Componentes	Cantidad / Volumen	Indicaciones
Solución Amortiguado-ra de Fosfatos (PB) 10x	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O Na ₂ HPO ₄ anhidro H ₂ O	2.62 g 11.50 g 1000 ml	<ul style="list-style-type: none"> • Medir 800ml de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado. • Pesar 2.62g de NaH₂PO₄ H₂O (fosfato de sodio monobásico), se agrega al vaso de precipitado y se disuelve. • Pesar 11.5g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico anhidro), se adicionan al vaso de precipitados y se disuelve (ésta sal tarda en disolverse). • Aforar a 1000ml con agua destilada. • Envasar en un frasco de plástico se etiqueta y guardar a 4⁰C.
Solución Amortiguado-ra de Fosfatos (PBS pH 7.2)	PB 10X NaCl H ₂ O	100 ml 8.75 g 900 ml	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatos 0.1M, salina 0.015M. • En una probeta medir 100ml de PB 10X y vaciarlo en un vaso de precipitado. • En la misma probeta medir 900ml de agua destilada, agregarla al vaso de precipitado que contiene PB 10X y mezclar. • Agregar 8.75g de NaCl (cloruro de sodio) y disolver. • Se ajusta el pH de la solución a 7.2

			<p>con HCl 1N o con NaOH 1N.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Envasar en un frasco de plástico. Se etiqueta y guardar a 4°C
Solución de Lavado (PBS-Tween 0.05%)	PBS pH 7.2 Tween 20	1000 ml 500 µl	Conservar en refrigeración a 4°C.
Reactivo	Componentes	Cantidad / Volumen	Indicaciones
Solución Amortiguadora de Carbonatos 0.1M pH 9.6	Na ₂ CO ₃ NaHCO ₃ H ₂ O destilada	3.18 g 5.86 g 1000 ml	<ul style="list-style-type: none"> • En una probeta medir 800ml de agua destilada y vaciarlo en un vaso de precipitado. • Agregar 3.18g de Na₂CO₃ y disolver. • Agregar 5.86g de NaHCO₃ y disolver. • Ajusta el pH a 9.6 con HCl 1N o NaOH 1N. • Aforar a 1000ml. • Envasar en un frasco de vidrio, etiquetar y guardar a 4°C.
Solución Albúmina Sérica Bovina 1%	ABS PBS – Tween 20 al 0.05%	1 g 100 ml	Conservar en refrigeración a 4°C.
Solución H ₂ SO ₄ 2N	H ₂ SO ₄ Concentrado H ₂ O destilada	53.3 ml 1000 ml	Agregar lentamente el ácido al agua, manteniendo el matraz aforado en baño de hielo
Solución Bloqueadora de Leche Descremada 5% en PBS-	Leche Descremada (Sveltes®) PBS - Tween 20 al 5%	5 g 100 ml	Se guarda en un frasco de vidrio y a 4°C

T 0.05%			
Buffer Citrato Fosfato 75mM pH 5.0	Ácido cítrico Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	1.92 g 2.85 g 100ml	Conservar en refrigeración a 4°C
Sustrato para ELISA (<i>Trichinella spiralis</i>)	Buffer Citrato – Fosfato 75mM o-fenil-diamina (en congelación) H ₂ O ₂ al 30%	10 ml 5 µg 12 µl	Sólo para uso inmediato.
Extran	Extran	1000 ml	
DIGESTION ARTIFICIAL			
	Pepsina 1 % HCl 1% H ₂ O	1g 1ml 100 ml	Cantidades propuestas para 100g de muestra
TINCION CON HEMALUMBRE DE MEYER			
REACTIVO	COMPONENTES	CANTIDAD/ VOLUMEN	INDICACIONES
Éter	Éter	500ml	Envasar en un frasco de plástico, se etiqueta y conserva a temperatura ambiente.
Formol 10%	Formol Agua destilada	100 ml 900ml	
Alcohol ácido 70%	Alcohol absoluto Agua destilada	700ml 300ml	
Alcohol 80%	Alcohol absoluto Agua destilada	800ml 200ml	
Alcohol 96%	Alcohol absoluto Agua destilada	960ml 40ml	
Alcohol absoluto	Alcohol absoluto	1000ml	