



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**“Inmunodiagnóstico de *Trichinella spiralis*
Owen 1838 (Nemata Adenophorea) en suero de cerdo
(*Sus scrofa*) en localidades del estado de Puebla,
México”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO EN
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

pBíol. Estefany Luna Espinoza

DIRECTOR DE TESIS: Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Fecha Octubre 2015





“Inmunodiagnóstico de *Trichinella spiralis* Owen 1838 (Nemata Adenophorea) en suero de cerdo (*Sus scrofa*) en localidades del estado de Puebla, México”



AGRADECIMIENTOS

Al doctor Lino Zumaquero Ríos, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por las llamadas de atención y más aun por tomarse el tiempo de corregirme gracias por esta hermosa experiencia.

Al doctor Jorge Zarracent por enseñarme con tanta dedicación y brindarme su apoyo aunque él estuviera en cuba, siempre recibí respuesta de mis dudas.

A M. en C. José Ángel Francisco Flores Hernández y M. en C. Hugo Rodolfo Molina Arroyo, por las revisiones y consejos para que este trabajo fuera finalizado.

A M. en C. Roció Bustillos Cristales por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio en el ICUAB, enseñarme de Genética por los consejos y el cariño que me dio.



DEDICATORIAS

A mi madre Julia que siempre me ha apoyado en todas mis decisiones, buenas o malas por confiar en mí y por todo su esfuerzo para sacarnos adelante a mi hermana y a mi

A mi segunda madre, la Enfermera Marinely que mas que tía me acogió en su casa y me enseñó el valor de la familia y el calor de hogar, por apoyarme todos los días de la carrera, despertarme temprano por darme ánimos cuando ya no podía mas, por confiar en mí y por las cenas en familia que duraban horas platicando de cómo nos había ido en el día.

A mis tías, Doctora Ma. Del Socorro Luna, y Doctora Ma. Félix Luna por brindarme el apoyo económico cuando lo necesitaba por sus consejos por quererme tanto como yo las quiero y las estimo, por ser mis guías en la vida.

A mi tía Criminóloga Miriam Espinoza por ser mi amiga mi confidente y por ese amor que hay entre nosotros y por darme a mi primo Diego.

A mis demás tíos, Ing. Javier Espinoza, Antropólogo Luis Espinoza, Ing. En sistemas Alma Jiménez, M. en C. Víctor Luna, Maestra Verónica Montero, Teresa Espinoza, gracias por su apoyo siempre.

A mi abue Remedios Muñoz por darme de desayunar todos los días por preocuparse y esperarme cuando salía de la casa para ir a la escuela.



A mi hermana Liz por ser parte de mi vida y ser tan tripolar y a mis primos, Mariana, Gerardo, Alan, Yaretzy, Mily, Diego, Luis, Alexis, Dyana, Tanya, Belem, y el más pequeño de todos Javi, que me alegra el día cuando me dice tamo y los demás que le echen ganas que vean que si se puede .

A mi novio p.QFB. Ricardo Cuatlayolt, por ser el apoyo más grande en mi vida por ayudarme y sobre todo por todo el amor que me da todos los días.

A la sra. Paty Olarte y al sr. Manuel Cuatlayolt, por preocuparse por mí y por quererme mucho y por preguntarme casi todos los días que nos veíamos por la tesis, al fin les puedo decir aquí esta, la termine.

A mis amigos Chef Cristian de la luz, QFB. Ana Laura ,p.QFB. Carolina Águila, Alma Teniza, biol.Karen del Karmen, p.Biol. Brenda Leana, biol. Mónica de la Cueva, Biol. Raúl Angulo, p.Biol. Paola Salazar, gracias por todos esos momentos de locura y dolores de estomago por los ataques de risa, por los proyectos compartidos y las horas libres.

A mis amigos de la vida Ana Karen Ortega, Dra. Nathalie, psicóloga Arely, lic. En idiomas Guillermina y Orlando Cabello mis confidentes amigos de muchos años gracias por todo.

A mis abues que ya no nos acompañan pero creo que todos daríamos un día de nuestras vidas por tenerlos aquí aunque sea un minuto mas, Juana Perez , Javier Espinoza y Fernando Luna.



RESUMEN

La triquinosis o trichinelosis es una zoonosis parasitaria de origen alimentario y de distribución mundial causada por la larva muscular del nematodo *Trichinella spiralis*, la infección en los seres humanos se produce con la ingestión de larvas del nematodo de modo accidental que se encuentran enquistadas en el tejido muscular de la carne de los animales domésticos como el cerdo y bovinos, entre otros, la ingestión de productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados procedentes de animales infectados.

El diagnóstico humano suele ser mediante la determinación de anticuerpos o de manera post mortem; la determinación vía anticuerpos tiene como desventaja el hecho de que la detección suele ser efectiva a partir de la 3-4 semana post-infección y el diagnóstico post-mortem tiene una baja sensibilidad comparado con el método antes mencionado.

El desarrollo de una técnica para la detección de antígenos de *Trichinella spiralis* (Owen1838) en suero sanguíneo de cerdo (*Sus scrofa*) que evidencie una infección activa y reciente, permite diagnosticar la presencia del parásito en estadios iniciales de la infección.

En el presente estudio se detectó por primera vez para el Estado de Puebla la presencia de antígenos, y anticuerpos de *T. spiralis* en suero de *Sus Scrofa* (cerdo) provenientes de diferentes puntos del estado de Puebla (San Andrés Azumiantla, Izucar de Matamoros, San. Martin Texmelucan) lo cual pone en evidencia que el parásito está presente en la población de cerdos distribuidos para el consumo humano en el estado ya sean criados en traspatio o en granjas establecidas

De las 240 muestras analizadas en las tres localidades se obtuvo una seroprevalencia para anticuerpos de 4.29% en San Martin Texmelucan, 43.55% para San Andrés Azumiatla, y 9% en Izucar de Matamoros. Para la detección de antígenos se obtuvo una seroprevalencia de 1.43% para San Marín Texmelucan, 3% para Izucar de Matamoros y 4.84% en San Andrés Azumiatla.

En el inmunoensayo se observó un grado de dispersión mayor en las muestras obtenidas en San Andres Azumiatla lo cual se asocio a la disparidad en la alimentación, edad de los individuos y al hecho de que no provenían de un solo lugar de crianza.



CONTENIDO

RESUMEN	6
CONTENIDO	7
1. INTRODUCCION.....	8
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS.....	26
5. MÉTODOS	27
6. RESULTADOS	34
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIÓN.....	45
9.- BOBLOGRAFÌA	46
10.-ANEXOS	51



1. INTRODUCCION

La triquinosis o trichinelosis es una enfermedad crónica que afecta a unos 11 millones de personas en todo el mundo (Crompton & Savioli ,2010), esta enfermedad no sólo es un peligro para la salud pública por la afectación a los humanos, sino que también representa un problema económico en la seguridad alimentaria de la producción porcina. (Acha ,2003) Esto tiene una relación con la dificultad en la detección de la enfermedad, el ineficiente control sanitario en la carne del cerdo infestada y la práctica frecuente de matanza clandestina de animales de traspatio, así como el expendio de subproductos cárnicos como víscera y sangre contaminada (Gottstein & Pozio,2009)

El agente causante de la enfermedad son nemátodos del género *Trichinella*, principalmente *Trichinella spirallis* (Owen1838) esta especie es un pequeño nemátodo del intestino y de los músculos de mamífero (Acha ,2003), de igual forma las aves y los reptiles pueden ser huéspedes de *Trichinella* (Caracostantogolo & Martínez, 2009 ; OIE, 2012), la infección en los seres humanos se produce con la ingestión de larvas del nemátodo de modo accidental, que se encuentran enquistadas en el tejido muscular de la carne de los animales domésticos o salvajes, y la ingestión de productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados procedentes de animales infectados. En los seres humanos, la dosis mínima infecciosa causante de la enfermedad no está claramente definida. (Gottstein & Pozio,2009; Moreno & Muñoz, 1993)



Las larvas de *Trichinella spiralis* (Owen1838) enquistadas en los músculos de cerdos pueden permanecer con capacidad infectante durante no menos de 90 días (Jovic *et al.*, 2001), se ha reportado que algunos nemátodos de este género son resistentes a la congelación (-18°C) y temperaturas de hasta 42°C por 5 horas (Chávez *et al.*, 2006; Malakauskas &Kapel 2003; Kotula *et al.*, 1983)

En algunos países en vías de desarrollo la prevalencia de esta enfermedad es mayor debido a las condiciones socioeconómicas y de insalubridad que favorecen su trasmisión (Ramírez,1981).

En el continente Americano, la enfermedad se ha presentado en Canadá, Chile, los Estados Unidos, México, Uruguay, Venezuela y Argentina. En algunos otros países o territorios, se han registrado casos aislados, pero no se ha aclarado si son autóctonos o de inmigrantes. En Canadá se han registrado pocos brotes de esta enfermedad. En 1974,1975 y 1976 se presentaron 49, 3 y 31 casos clínicos, respectivamente.

En el examen del diafragma de personas fallecidas por diferentes causas, se han encontrado porcentajes de infección desde 1,5% en Toronto hasta 4 a 6% en la Columbia Británica (Acha, 2003).Hasta el momento se han hallado vertebrados infectados en todos los continentes con excepción de la Antártida (Caracostantogolo & Martínez, 2009).

Esta zoonosis es endémica en el país de México la cual afecta a los animales salvajes y domésticos (criados en granjas y traspatio), al humano (Caracostantogolo & Martínez, 2009;Ramírez,1981).

La triquinosis es muy fácil de confundir con la influenza debido a la similitud de síntomas, de modo que hay muchos diagnósticos errados, esto hace que exista una gran diferencia entre la prevalencia real de la enfermedad y la prevalencia que se diagnóstica o es notificada. (Gottstein & Pozio, 2009).

Taxonomía del género *Trichinella*

Se conocen 11 especies o genotipos de *Trichinella* cuya distribución mundial difiere (figura 1) los cuales son: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*, T6, T8, T9 y T12. (Krivokapich et al., 2012 Pozio, 2009).

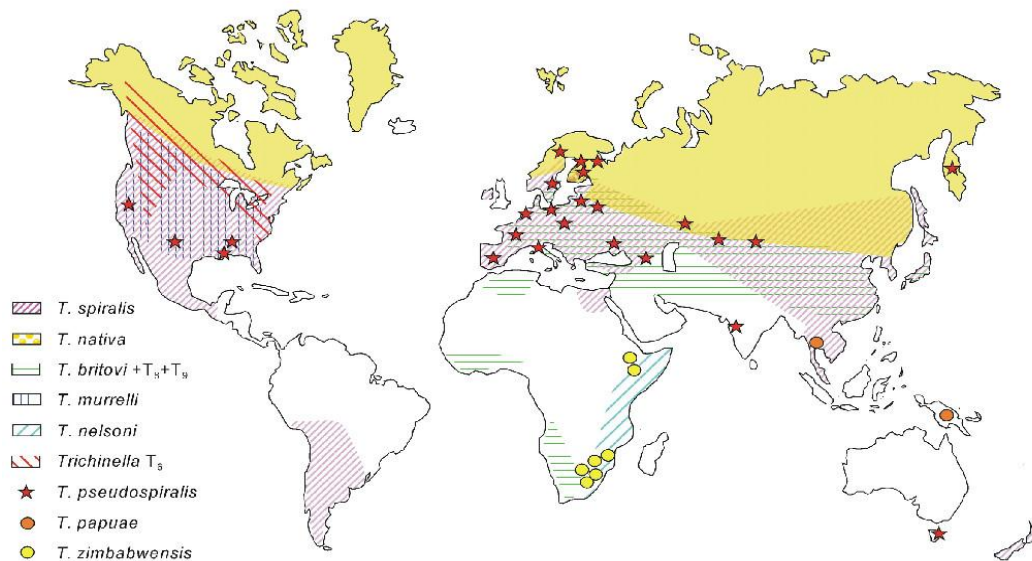


Figura 1. Distribución del género de *Trichinella* en el mundo, del lado izquierdo se observan 10 de las 11 especies de *Trichinella* en el mundo (www.trichinella.org, 2013).

La clasificación taxonómica de *Trichinella* se describe en la tabla 1, esta se encuentra conformada por dos ramas principales: la de las especies en las cuales las células musculares del hospedador que invaden son rodeadas por una cápsula de colágeno a las cuales se le llama en capsuladas y la de aquellas especies en las que no ocurre tal encapsulación se les denomina no encapsuladas (Chávez et al.,2006).

Phylum:	Nematoda			
Clase:	Adenoforea			
Orden:	Enoplida			
Superfamilia:	Trichuroidea			
familia:	Trichinelloidea			
Género:	<i>Trichinella</i>			
Especie:	<i>T. nativa</i>	<i>T. pseudospiralis</i>	<i>T. britovi</i>	<i>T. nelsoni</i>
	<i>T. spiralis</i>	<i>T. papuae</i>	T6	T8
	<i>T. murrelli</i>	<i>T. zimbabwenis</i>	T9	
	A		B	C
				D

Tabla1. Taxonomía del género de *Trichinella* (Chávez et al.,2006).

El grupo A se caracteriza por tener una distribución mundial y que presenta cápsula, el grupo B no presenta cápsula y su distribución es mundial, el grupo C se distribuye únicamente en zonas templadas y el grupo D en zonas cálidas, asimismo los grupos C y D se presentan en hospedadores específicos y se hacen recubrir por una cápsula de colágeno, otras diferenciaciones de las especies del género *Trichinella* spp. Se presentan a continuación: *T. spiralis* se la encuentra en ciclos epidemiológicos domésticos, peridomésticos y silvestres. Es altamente infectante para cerdos, ratas, humanos y podrían causar la muerte, en casos de infecciones muy severas y falta de tratamiento oportuno (Gracey et al., 1999). Se ha detectado en más de 36 países de todos los continentes (Franco, 2012) y su prevalencia es alta en Europa y Asia (Moreno & Muñoz, 1993), tiene la capacidad de alternar su ciclo de vida entre los estadios



Entéricos y en el músculo esquelético de sus hospedadores, está adaptada a zonas templadas y se considera cosmopolita (Caracostantogolo & Martínez,2009), *T. nativa* circula entre carnívoros silvestres como osos y zorros y sus presas, la especie es altamente infectante para el ratón y levemente para la rata, el hámster, el cobayo, el conejo y el cerdo, no infecta a las aves. La larva sobrevive en el músculo por más de 12 meses cuando se la expone a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$, es una especie localizada exclusivamente en regiones árticas y sub- árticas,*T. nelsoni* circula entre carnívoros como zorros, panteras, leopardos, leones, hienas y jabalíes. La especie es levemente infectante para los ratones, ratas, hámsters y cerdos, moderadamente patogénica para el ratón, levemente para las ratas, y menos patogénica que *T. spiralis* para el hombre, no infecta a las aves, es resistente a las temperaturas elevadas, se localiza en la región africana subsahariana,*T. pseudospiralis* circula entre predadores de aves y sus presas. Es altamente infectante para el hámster y para las ratas pero menos patogénica que *T. spiralis* para los monos y para el hombre, a diferencia de las otras especies, no forma quistes e infecta a las aves, la larva en el músculo muere en tres días a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$, se localiza en Europa, India, el norte de EUA, y Oceanía ,*T. britovi* circula entre carnívoros silvestres, principalmente zorros, lobos y mustélidos y sus presas silvestres, los jabalíes. La especie es poco infectante para ratones, ratas y cerdos, menos patogénica que *T. spiralis* para el hombre y menos resistente a la congelación que *T. nativa*. también se encuentran en áreas templadas, aunque solo se ha reportado en Europa. Los grupos genéticos T5, T6 y T8 tienen una localización discreta. (Barriga, 2003)

Trichinella spiralis

Las primeras observaciones de *Trichinella spiralis* fueron realizadas en músculos procedentes de autopsias de cadáveres humanos en el hospital Guy de Londres por los doctores Peacock en 1828 y por Hilton en 1833, sin que llegaran a establecer la naturaleza del agente. El crédito al descubrimiento de este parásito se debe a James Paget, quien lo descubrió en un hombre que murió de tuberculosis. El zoólogo británico Richard Owen estudio porciones de músculo del caso descubierto Paget y descubrió más ampliamente el parásito el cual denominó *Trichinella spiralis* en 1838 (Gottstein & Pozio,2009) y se creyó que era una sola especie hasta que en 1972, investigadores soviéticos determinaron que se trataba de varias especies. Durante mucho tiempo hubo discusiones sobre la categoría taxonómica de las nuevas entidades, sus especies, sub- especies, cepas o variedades. (Acha ,2003)

Morfología

Trichinella spiralis (Owen1838) es un pequeño nemátodo blanquecino cilíndrico, con la extremidad anterior más delgada que la posterior. La hembra mide 3.5 mm de largo por 0.06 mm de ancho, el macho mide 1.5 mm de largo por 0.05 mm de ancho (Maldonado ,2007), la hembra posee un solo ovario localizado en la parte posterior que produce óvulos de aproximadamente 25 micras de diámetro, los cuales presentan sólo tres cromosomas. (Correa *et al.*, 2006), los machos presentan dos apéndices caudales lobulados en la región caudal del ano y carecen de espículas copulatrices y sus espermatozoides no son flagelados, su número cromosómico puede ser de dos o tres de modo que determina el sexo de la descendencia. (Carrol,*et al.*, 1970)

Las larvas recién nacidas miden aproximadamente 100 μm de longitud, mientras que las formas infectantes larva L1 enquistada en el músculo mide 1 mm, el quiste que la contiene es de forma ovalada y mide de 250 a 500 μm de diámetro máximo(figura 2). (Correa *et al.*, 2006)



Figura 2 *Trichinella spiralis*. Nematodo enquistado en músculo
Escuela de Biología BUAP.

Ciclo biológico

Trichinella spiralis es un organismo intramuscular obligado, sexuado, todos sus estadios ocurren en un solo hospedero. (Barriga, 2003; Moreno *et al.*, 2009). su ciclo presenta dos fases, una entérica durante la cual el parásito pasa por cuatro estadios larvarios hasta transformarse en adulto, y otra parenteral, que incluye la larva recién nacida (LRN) y la larva muscular enquistada (L1).(Correa *et al.*, 2006; Pozio *et al.*,2009), el género *Trichinella* Incluye una amplia gama de especies hospedadoras entre ellas mamíferos, aves y reptiles; aunque sólo los seres humanos se hacen clínicamente afectados (Gottstein & Pozio,2009).

La etapa infecciosa es la primera fase (L1) la larva que se encuentra en las células del músculo estriado de una amplia gama de huéspedes. Tras la ingestión de tejido muscular infectado por *Trichinella* por un nuevo



huésped, las larvas son liberadas por los procesos digestivos. Las larvas entran en el intestino delgado y se introducen en la lámina propia de las vellosidades en el yeyuno. Los gusanos adultos se aparean y producen larvas recién nacidas, la copula se da en el nicho intramulticelular entre las 37 y 40 horas pos infección (cada macho puede fecundar 2 hembras) Los gusanos hembras adultos en el intestino delgado continúan produciendo larvas en la mayoría de los casos durante varias semanas antes de que sean expulsados. Cada gusano hembra tiene aproximadamente 1500 larvas recién nacidas, pero esto varía en base a las especies de *Trichinella* y el tipo de hospedero. (Carrol *et al.*, 1970; Moreno *et al.*, 2009)

Las larvas recién nacidas dejan el intestino y migran, a través del sistema circulatorio, al tejido muscular estriado. Durante la migración, las larvas entran en varios tejidos, incluidos los del miocardio, cerebro, y otros sitios, pero aquí tampoco se degradan y pueden volver a entrar en el torrente sanguíneo. Generalmente, sólo las larvas que alcanzan los músculos estriados son capaces de continuar el desarrollo. Penetran en el sarcolema de las fibras, donde maduran. Se convierten en espiral dentro de las fibras y, en el caso de algunas de las especies, se encapsulan como resultado de la respuesta celular del huésped, el tiempo requerido para el desarrollo completo tarda de 17 a 21 días (tiempo de exposición a la aparición y el enquistamiento de las larvas en la musculatura). La larva se hace infectante para el próximo huésped cuando se da la invasión del músculo (Barriga, 2003).

Las larvas del parásito pueden sobrevivir durante hasta 40 años en los seres humanos y en otros mamíferos más de 20 años, el quiste

encapsulado con el tiempo se calcifica y como resultado la larva muere (Gottstein & Pozio,2009; Correa *et al.*, 2006).

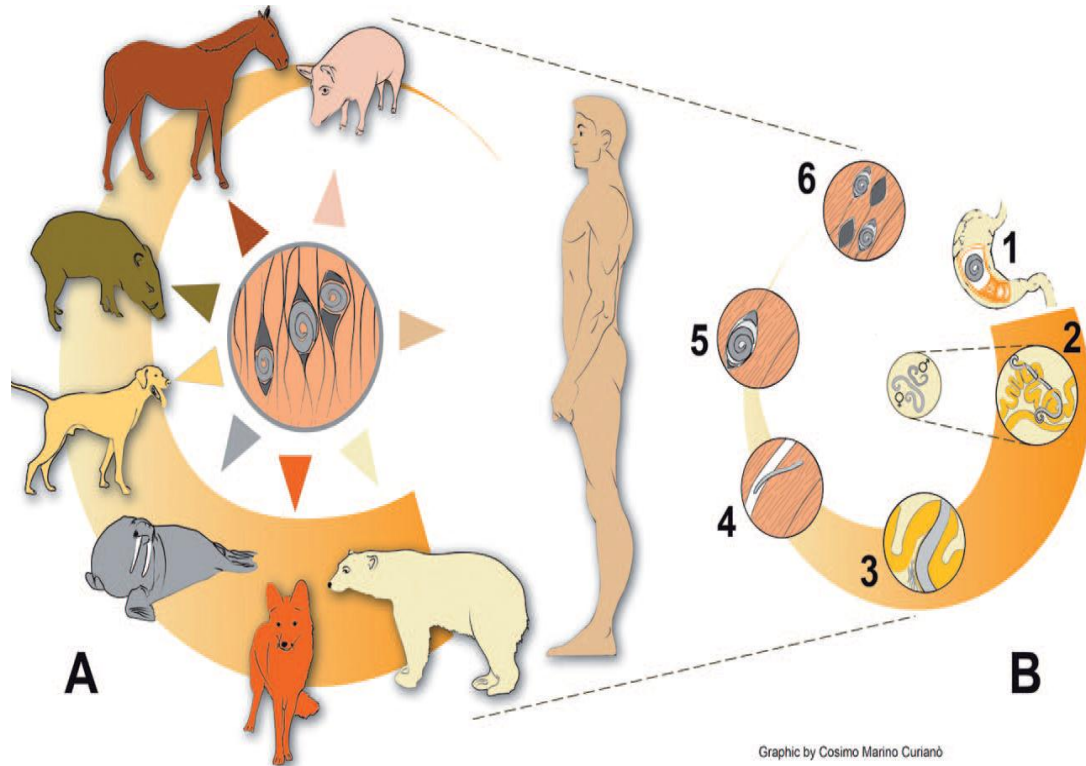


Figura 3.- ciclo biológico de *Trichinella sp.* Lado A se muestra las principales fuentes de infecciones para los seres humanos. Lado B el proceso de infección del hospedador. (Gottstein & Pozio,2009)

Epidemiología.

La triquinosis es cosmopolita. La fuente de infección habitual es el cerdo doméstico; sin embargo, se han reportado brotes epidémicos por ingesta de carne de cerdo, caballo, jabalí, perro y bovino principalmente. (Murrell & Pozio, 2011). Los brotes se asocian principalmente al mantenimiento de cerdos de “traspatio”, alimentados de desperdicios y con pobre control veterinario (Berrueta, 2013).

En el hábitat doméstico, el cerdo y las ratas son la principal fuente de infección, siendo las ratas las que contribuyen a la propagación de *Trichinella spiralis* entre especies silvestres y domésticas, por ejemplo, en la cría traspatio, muchos cerdos son infectados cuando son expuestos a la intemperie e interactúan con ratas llegando a ingerirlas, o cuando son alimentados con desperdicios de cadáveres de otros animales que pueden estar contaminados (Shad *et al.*, 1987 ; Fabregas & Benito 2001).

En un muestreo llevado a cabo en Croacia sobre 2287 ratas capturadas en 60 granjas, se halló que solo había ratas infectadas donde había cerdos infectados y el manejo sanitario era deficiente, concluyéndose en que, para las condiciones del área estudiada, la rata era una víctima de la manipulación inapropiada de los cerdos más que un reservorio de la enfermedad de *Trichinella* (Stojcevic *et al.* ,2004)



Un análisis de los brotes reportados desde 1986 a 2009, ofreció los siguientes datos: 65,818 casos y 42 muertes en 41 países. La Organización Mundial de la Salud Región Europea representó el 87% de los casos, 50% de los cuales ocurrieron en Rumania. La triquinosis afectó principalmente a adultos (edad media 33.1 años). Las principales manifestaciones clínicas, de acuerdo a 5,377 casos, fueron: mialgias, diarrea, fiebre, edema facial y cefalea. El cerdo fue la principal fuente de infección (Murrell & Pozio, 2011).

Argentina es uno de los países con casos más recientes, con dos reportes, uno en 2010, donde se analizó por digestión enzimática, diferentes animales silvestres y roedores, fue en estos últimos donde se descubrió el mayor número de casos, 9 en total (Ribicich *et al.*, 2010), el otro reporte fue en 2012, donde se analizaron 179 cerdos y se encontró evidencia indirecta de la enfermedad en 20% de los ejemplares analizados. (Molina *et al.*, 2012), En el periodo de 2004-2012 fueron comunicados en la provincia de Buenos Aires 1546 casos humanos confirmados de triquinosis (Bolpe *et al.*, 2013).

Los conocimientos sobre la prevalencia de la triquinosis en México empezaron a generarse desde finales del siglo XIX, pues se encontró en cerdos de la ciudad de México desde 1862, pero no fue sino hasta 1891 cuando el parásito se detectó en cadáveres estudiados en la Facultad de Medicina de la UNAM. Después de estos informes, se ha hecho referencia a infecciones por *Trichinella* en múltiples ocasiones, tanto en humanos, como en cerdos, ratas, gatos, perros y otros animales. (Correa *et al.*, 2006)



En México la investigación epidemiológica relacionada con la triquinosis, indica que esta enfermedad tiene una frecuencia hasta de 8.1% de la población general, por lo que se considera un problema de salud pública (Moreno,2012), las infecciones por este parásito en cerdos, perros, gatos y ratas han sido reportadas en varios estados de México como: Zacatecas, Durango Chihuahua, Guanajuato, Jalisco, Estado de México, Distrito Federal, Querétaro, Guerrero, Colima, San Luis Potosí, Hidalgo, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Sonora ,no así para el estado de Puebla,(Ortega *et al.*, 2000 ;Flores & Moreno, 2000) se han detectado caballos infectados, lo cual constituye un factor de riesgo, ya que su carne la consumen de forma habitual algunas personas, También se han identificado infecciones en perros, gatos, ratas y algunos animales exóticos en zoológicos. (Berrueta, 2013).

En Zacatecas el primer brote se registró en 1978 en donde se infectaron 18 personas y 5 de ellas murieron (Fragoso *et al.*, 1981). En el mismo estado se inspeccionaron 51 lenguas de perros colectadas en el departamento de farmacología de la unidad académica medicina humana y ciencias de la salud, 3 de ellas salieron positivas a *Trichinella spiralis* (Owen1838) mediante técnicas de comprensión (triquinoscopia) y digestión artificial. (Berrumen *et al.*, 2002) también se detectó esta enfermedad en cerdos y humanos en 7 poblados de esta entidad, y el total de los casos encontrados fue de 132. El municipio de Pánuco destacó por ser el de mayor incidencia (Cabral *et al.*, 1999).

En el 2004 se detectó el parásito en embutidos de carne de cerdo, en varios estados de la república de los cuales destacan, el estado de México, Distrito Federal, Morelos, Michoacán y Jalisco (Zabala, 2004).

Sandoval *et al.*, (2012) trabajaron con músculos de cerdos, el trabajo fue realizado en el rastro de Zacatecas, donde se analizaron 100 muestras de suero de cerdo mediante detección de anticuerpo por técnica ELISA, se observó anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en 10 individuos.

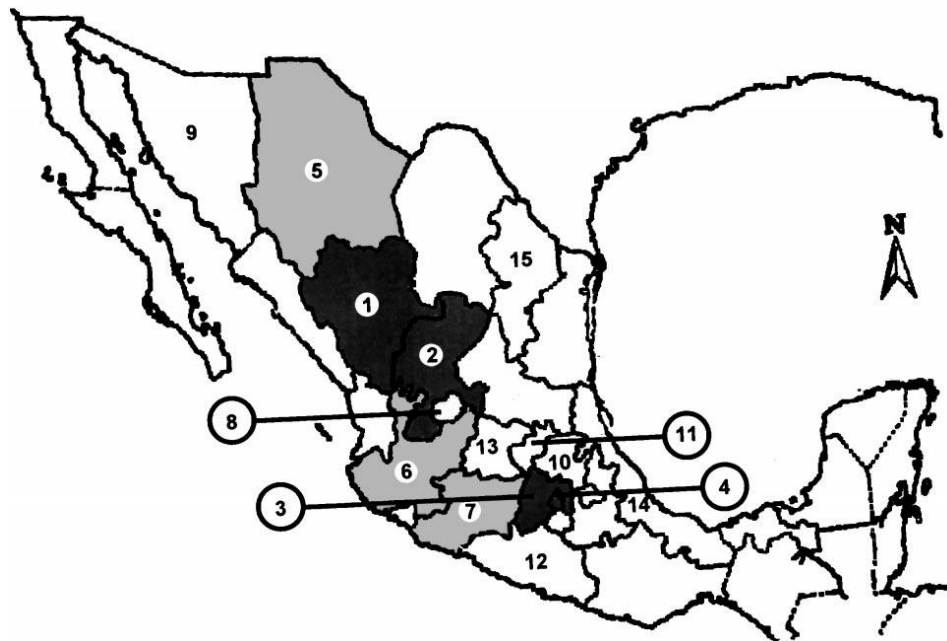


Figura 4: Estados de México donde ha sido reportado casos de triquinosis. Estados con gran incidencia (●) incluye: Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México(3), Ciudad de México (4); estados con incidencia media (●) incluyen: Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); estados con baja incidencia (○) incluye: Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14) y Nuevo León (15).
(Ortega-Pierres *et.al*, 2000)



Diagnóstico

El diagnóstico en humanos de *Trichinella spiralis* (Owen1838), tiene varias complicaciones, ya que puede ser confundido clínicamente con más de 50 enfermedades, los métodos de detección más comunes recurren a la obtención del parásito mediante invasión muscular, es por esto que cuando se presentan manifestaciones clínicas, se hace necesario una confirmación mediante pruebas de laboratorio menos invasivas como son las pruebas serológicas (Ortega-Pierres ,1995).

Las pruebas directas para la detección del parásito incluyen un examen físico, la demostración directa del parásito por triquinoscopía (figura 5), y la digestión del músculo esquelético con jugo gástrico artificial o solución de pepsina y ácido clorhídrico(figura 6) (De La Rosa *et al.*, 2000; Correa *et al.*, 2006), comparando ambos métodos la digestión del músculo es aún más sensible, eficiente, fiable y rentable, sobre todo en países no endémicos por lo cual se ha convertido en el método de elección para inspecciones de rutina en estos países. (Gajadhar, 2009 ; García, 2003)

Otros métodos directos incluyen la inoculación en animales de laboratorio (xenodiagnóstico), en este método se utilizan muestras de músculo estriado, cardíaco o diafragmático, y la sensibilidad de esta prueba depende de la cantidad de tejido examinado, la especie del parásito (dos de ellas resisten menos estos procedimientos), el sitio de donde se obtiene, el momento de la infección y la carga parasitaria. Otras opciones incluyen la detección del material genético del parásito mediante sondas de ácidos nucleicos y amplificación del DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha permitido



detectarlo en ratones, cerdos, caballos y animales silvestres infectados experimentalmente con *Trichinella* (Correa *et al.*, 2006).

La detección del parásito también puede ser realizada por métodos indirectos como son las pruebas serológicas. Dentro de estas se incluyen el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el Western blot, los cuales son los

Métodos más efectivos para el diagnóstico de la enfermedad, los anticuerpos pueden persistir durante años, las pruebas serológicas tienen valor especial si a pesar de ser negativas al principio, posteriormente pueden dar un resultado positivo (seroconversión) (Correa *et al.*, 2006).

Las pruebas ELISA tienen una ventaja de una mayor sensibilidad frente a los métodos de digestión para la detección de triquinosis en los animales con infección ligera; esta sensibilidad es particularmente útil para la detección de la transmisión en curso en las granjas. Infecciones tan bajas como una larva por 100 gr. de tejido se han detectado mediante ELISA (figura 7)(Gajadhar, 2009).

Larvas por gramo	técnica
3	Triquinoscopia (solo para especies encapsuladas)
1	Métodos de digestión
0.01	ELISA detección de antígenos
0.01	ELISA detección de anticuerpos
0.001	Métodos basados en la PCR

Tabla 2.- Sensibilidad de los diferentes métodos de diagnóstico de la triquinosis (García, 2003)



Figura 5.- Técnica de Triquinoscopia observando evidencia de larva muscular Escuela de Biología BUAP.



Figura 6.- Proceso de Digestión enzimática con pepsina, de lado izquierdo el resultado de la digestión enzimática Escuela de Biología BUAP.



Figura 7.- Proceso de inmunoensayo enzimático (ELISA) Escuela de Biología BUAP.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico indirecto de *Trichinella spiralis* (Owen1838) es de gran utilidad en brotes epidémicos, la detección de anticuerpos hasta el momento ha sido la herramienta que ha solucionado la deficiencia diagnóstica de la enfermedad, debido a que la triquinoscopia es de muy baja sensibilidad al depender de la carga parasitaria, a la vez de ser invasiva pues se requiere de tomar muestra de tejido muscular del individuo. Por otra parte la digestión enzimática requiere al menos de 10 gr de musculo, aunque esta se ha convertido en prueba de oro para confirmar el diagnóstico indirecto. Sin embargo debido a lo anterior no es recomendable en la fase aguda lo cual permite que el individuo mantenga la infección y curse con la enfermedad por más de 15 días al ser confundida con más de 50 entidades morbosas

El inmunoensayo ELISA para detección de antígenos, permite un diagnóstico eficaz en el primer estadio de la infección ya que los antígenos llegan a presentarse durante la primera fase aguda cuando aún no se encuentra enquistado el parásito en el músculo.

La detección temprana del parásito en animales como el cerdo es de alta prioridad debido a que estos actúan como agentes propagadores de la enfermedad hacia la población humana.



3. JUSTIFICACIÓN

En México, a la triquinosis solo se le ha dado importancia cuando se han presentantado brotes, en diversos estados de la República Mexicana, la prevención de la sociedad es muy baja por la falta de información.(Reveles *et al* 2011 ,Ortega-Pierres ,2000).

El desconocimiento de la enfermedad aunado a una ingesta alta de carne de cerdo y sus subproductos, con deficiente control sanitario debido a prácticas extrainstitucionales y a una baja sensibilidad de la técnica usada en los rastros (triquinoscopía), obliga a buscar nuevas técnicas de sensibilidad alta y prevenir infecciones humanas.

Ante la falta de técnicas que permitan detectar la presencia del parásito en la primo infección. Debido al ciclo biológico y características del parasito se requiere identificar si se encuentra presente en el estado de Puebla ya que no cuenta con notificaciones de triquinosis, mismas que se han reportado en varias de las entidades federativas del país. Es por ello que este estudio está encaminado a identificar la presencia de triquinosis entre las poblaciones de cerdo (*Sus scrofa*) del estado.

El desarrollo de una técnica para la detección de antígenos de *Trichinella spiralis* (Owen1838) en suero sanguíneo de cerdo (*Sus scrofa*) que evidencie una infección activa y reciente, permitirá diagnosticar la presencia del parásito en estadios iniciales de la infección, pudiendo esto ayudar a plantear tratamientos específicos para la triquinosis.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar la presencia de antígenos (excreción- secreción) de *Triquinella spiralis* (Owen1838) y/o anticuerpos (totales) contra este parásito en sueros de cerdo (*Sus scrofa*) provenientes de localidades del estado de Puebla.

Objetivos particulares

Estandarización de la técnica de ELISA específica para la detección de Antígenos de *Triquinella spiralis* en sueros de cerdo (*Sus scrofa*).

Detectar la presencia de anticuerpos (totales) de *Triquinella spiralis* (Owen1838) en suero sanguíneo de cerdo (*Sus scrofa*) provenientes de distintas localidades del estado de Puebla.

Detectar la presencia de antígenos (excreción- secreción) de *Triquinella spiralis* (Owen1838) en suero sanguíneo de cerdo (*Sus scrofa*) provenientes de distintas localidades del estado de Puebla.

5. MÉTODOS

Localidades de estudio

Rastros o criaderos Traspatio de distintas localidades del estado de Puebla.

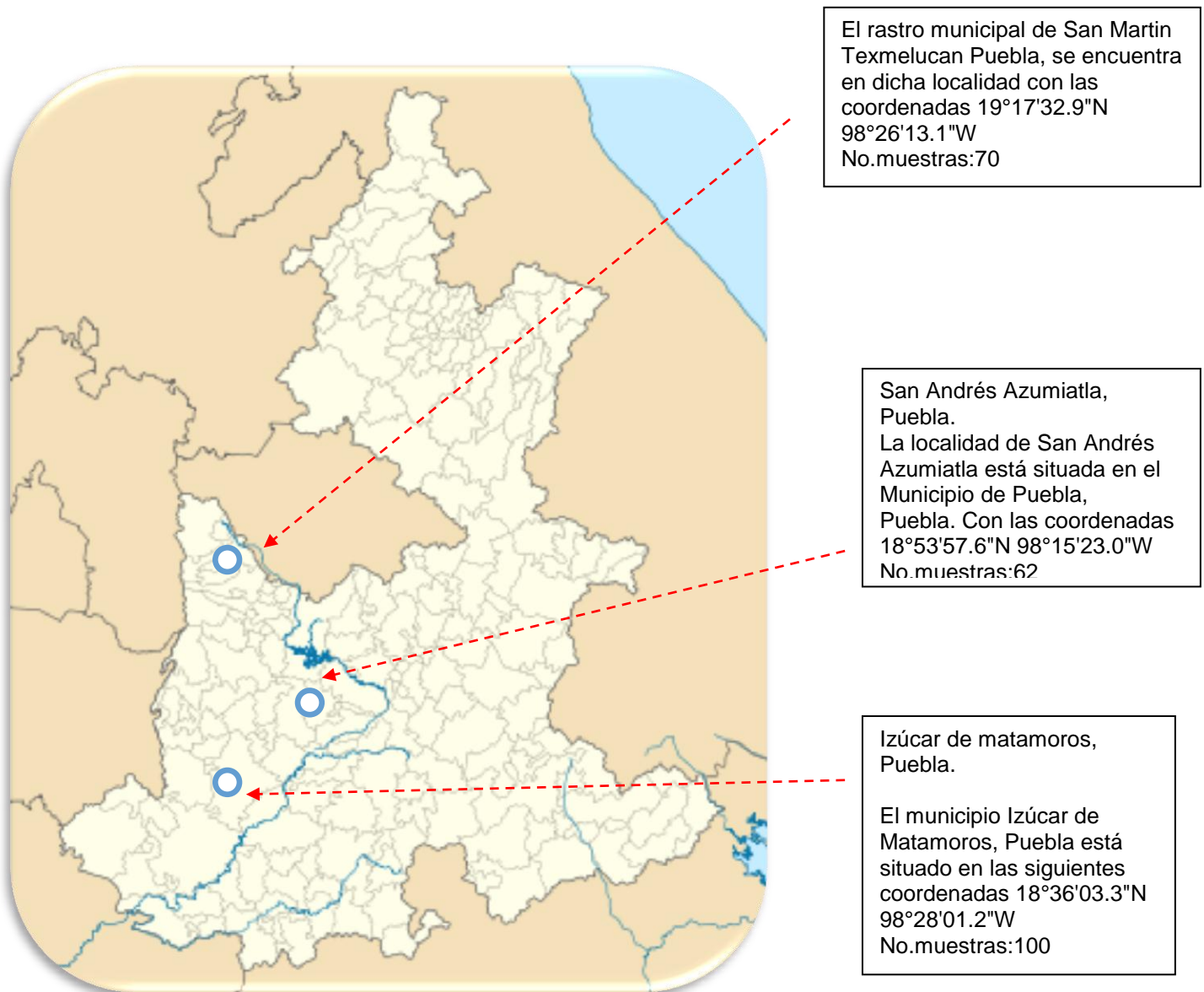


Figura 8.- Mapa del estado de Puebla (Google. INEGI 2015).



Muestreo

Se recolectó sangre de cerdos de distintas localidades del estado de Puebla, con un total de 70 muestras provenientes del rastro municipal de San Martín Texmelucan, de la misma manera en la localidad de San Andrés Azumiatla, se obtuvieron 62 muestras de cerdos criados en traspatio de casas de dicha localidad, finalmente en el muestreo realizado en el municipio Izúcar de Matamoros, se obtuvieron 100 muestras de cerdos criados en el traspatio.

Las condiciones higiénicas de los animales en traspatio no eran las adecuadas ya que se detectó la presencia de roedores en la zona de engorde y cría.

La sangre fue extraída usando tubos Vacutainer rojos, con activador de coagulo de capacidad de 4ml.

Obtención de suero sanguíneo

Los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm. Por 5 min para la obtención del suero, este se recuperó con una pipeta Pasteur plástica y puestos en microtubos de capacidad de 500 microlitros que fueron preservados en refrigeración a -20°C en un ultra congelador. Todas las muestras fueron debidamente etiquetadas con un número asignado, fecha y lugar de procedencia.



INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO

Se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Voller, 1978).

A las muestras obtenidas se les realizó el estudio de ELISA para la detección de anticuerpos para determinar si los animales entraron en contacto con el parásito o si estaban enfermos al momento de la extracción del suero.

A las muestras que resultaron positivas se les aumentó 20% de muestras negativas de las que arrojaron un resultado negativo se les realizó una prueba ELISA para detección de Antígenos con el uso de un Kit para la determinación de antígenos a través de un anticuerpo monoclonal proporcionados por el laboratorio de parasitología y la técnica a seguir fue la empleada por (Zumaquero et al 2012), la cual se realizó en laboratorio de parasitología de la escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Inmunodiagnóstico (ELISA) de anticuerpos Totales en suero porcino

La cantidad de placas o tiras a utilizar se seleccionaron de acuerdo al número de muestras a procesar.

- Recubrimiento de placas :
 1. Se agrego 1 μg de antígeno (Ag) de excreción-secreción por 1 ml de buffer de Recubrimiento.
 2. En cada pocillo se añadieron 100 μl .de la solución antes mencionada.
 3. Se cubrió con papel aluminio he incubo en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C
 4. Transcurrido la hora de incubación se elimino la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se seco el exceso de ella sobre una gasa
- Bloqueo:
 1. Se colocó 300 μl por pocillo de solución de bloqueo
 2. Se cubrió con papel aluminio he incubo en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 3. Transcurrido la hora de incubación se elimino la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavo los pozos con PBS Tween 4 veces.
- Disolución de las muestras:
 1. Se utilizo una dilución 1/50 , preparada con 10 microlitros de suero a analizar y 490 microlitros de PBS Tween.
 2. Se agrego 100 μl por pocillo de la Disolución del suero.
 3. Se cubrió con papel aluminio he incubo en cámara húmeda por 1hr a 37°C.



4. Transcurrido la hora de incubación se eliminó la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavo los pozos con PBS Tween 4 veces.
- Conjugado:
 1. Se agregó 1 μg Proteína G por 1 ml de de solución diluyente.
 2. Se colocó 100 μl de Disolución de Proteína G por pozo.
 3. Se cubrió con papel aluminio he incubo en cámara húmeda por 1hr a 37°C.
 4. Transcurrido la hora de incubación se elimino la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavo los pozos con PBS Tween 6 veces.
 - Sustrato:
 1. Se añadió 100 μl de Solución Sustrato por pocillo
 2. Se cubrió con papel aluminio y se deja reposar por 15 min.
 - Se detuvo la reacción agregando 50 μl de solución stop por pozo.

La prueba de ELISA para de detección de antígenos, consistió en añadir durante la primera fase anticuerpos policlonales, los cuales se fijarían a los Antígenos de *Triquinella spiralis*, Posteriormente en la segunda fase se añadieron Anticuerpos monoclonales, dando de esta manera mayor sensibilidad a la prueba, la técnica a seguir fue la empleada por (Zumaquero *et al* 2012), se realizó en laboratorio de parasitología de la escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Inmunodiagnóstico (ELISA) para la detección de antígenos de secreción-excreción en suero porcino

La cantidad de placas o tiras a utilizar se seleccionaron de acuerdo al número de muestras a procesar.

- Recubrimiento de placas :
 1. Diluir 10 μg de anticuerpo policlonal por 1 ml de buffer de Recubrimiento.
 2. Se colocó 100 μl en cada pozo.
 3. Se cubrió con papel aluminio he incubó en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 4. Trascurrido la hora de incubación se eliminó la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero.
- Bloqueo:
 1. Se colocó 300 μl por pocillo de solución de bloqueo
 2. Se cubrió con papel aluminio he Incubo en cámara húmeda 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 3. Trascurrido la hora de incubación se eliminó la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavó los pozos con PBS Tween 4 veces.
- Disolución de las muestras:
 1. Se utilizó una dilución 1/4 partes preparada con 25 microlitros de suero porcino en 75 microlitos de PBS Tween.
 2. Esta dilución se hizo directo en la palca
 3. Se cubrió con papel aluminio he Incubo en cámara húmeda 1hr a 37°C.



4. Trascurrido la hora de incubación se eliminó la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavo los pozos con PBS Tween 4 veces.
- Anticuerpo monoclonal:
 1. Se utilizó una dilución 2 μg de anticuerpo monoclonal por 1ml de solución diluyente.
 2. Se colocó 100 μl por pocillo de disolución de antígeno monoclonal
 3. Se cubrió con papel aluminio he Incubo en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 4. Trascurrido la hora de incubación se elimino la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavó los pozos con PBS Tween 4 veces.
 - Conjugado:
 1. Diluir 1 μl de conjugado anti ratón (1/1000) por 1 ml de solución diluyente.
 2. Se colocó 100 μl de Disolución de conjugado anti ratón por pozo.
 3. Se cubrió con papel aluminio he Incubo en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 4. Trascurrido la hora de incubación se eliminó la solución de recubrimiento por inversión de placa en el fregadero y se lavó los pozos con PBS Tween 6 veces.
 - Sustrato:
 1. Se añadió 100 μl de Solución Sustrato por pozo
 2. Se cubrió con papel aluminio y se dejo reposar por 15 min.
 - Se detuvo la reacción agregando 50 μl de solución Stop por pozo.

6. RESULTADOS

En total se analizarón 240 muestras: 70 provenientes del rastro municipal de San Martin Texmelucan , 62 muestras de cerdos criados en traspatio procedentes de la localidad de San Andrés Azumiatla y 100 muestras de cerdos criados en traspatio procedentes del municipio Izúcar de Matamoros (Tabla1).

Municipio	No. muestras	Tipo
San Martin Tex.	70	Rastro
San Andrés Azumiatla	62	Traspatio
Izúcar de Matamoros.	100	Traspatio

Tabla 2: clasificación de las muestras estudiadas

En el inmunodiagnostico con la prueba ELISA para detección de anticuerpo los cerdos de San Martin Texmelucan dieron positivo para 3 casos, los cerdos criados en traspatio procedentes de la localidad de San Andrés Azumiatla dieron positivo para 27 casos, así como Cerdos criados en traspatio procedentes del municipio Izúcar de Matamoros, dieron positivo para 9 (figura 9).

El valor de corte se calculó con el promedio de los suero negativos \pm 2 desviaciones estándar (Zumaquero *et al.*, 2012).

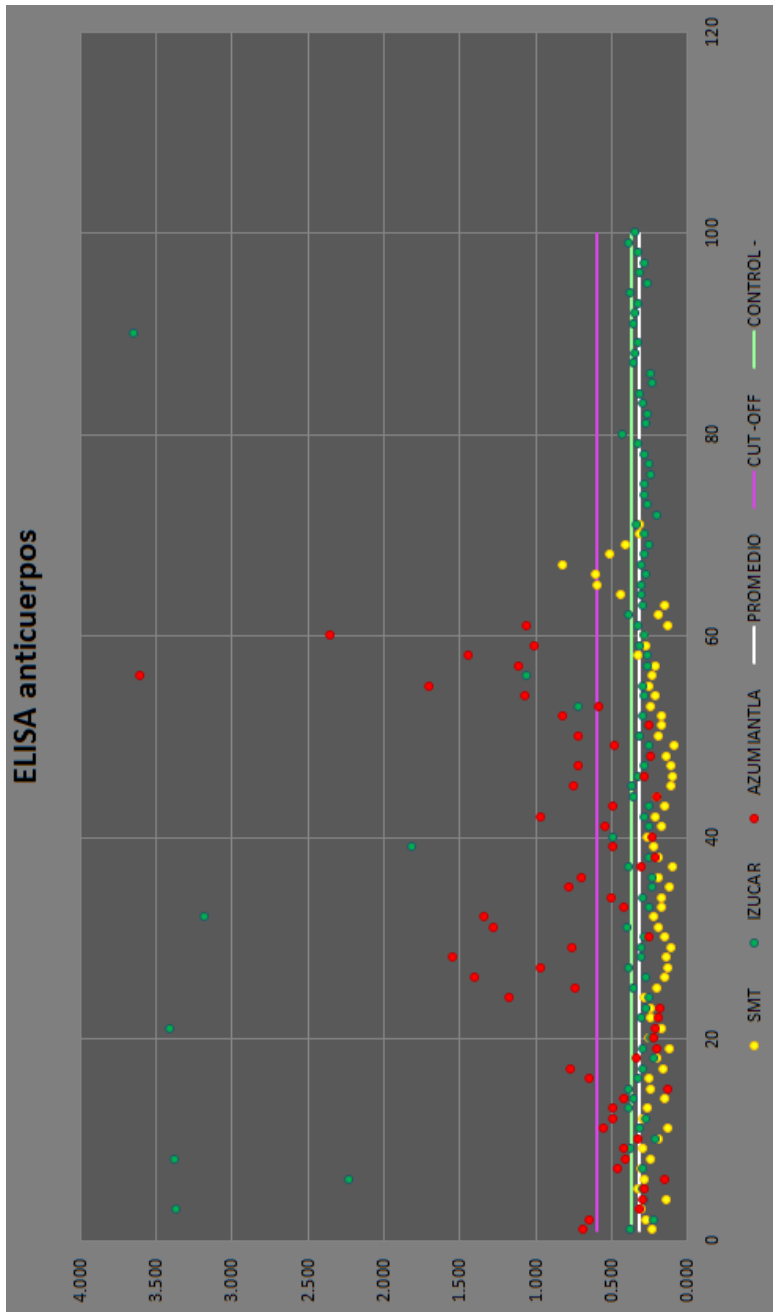


Figura 9: En este grafico se muestra las densidades ópticas obtenidas en la prueba de inmunodiagnostico ELISA para anticuerpo, para las muestras obtenidas en las tres localidades, se considera positivo todos los valores que estén por encima del valor de corte (0.599- 0.034)



El inmunodiagnostico realizado mediante la técnica ELISA para detección de antígenos, los sueros que fueron obtenidos de cerdos de San Martín Texmelucan resultaron positivo para 1 caso, los cerdos criados en traspatio procedentes de la localidad de San Andrés Azumiatla dieron positivo para 3 casos, los cerdos criados en traspatio procedentes del municipio Izúcar de Matamoros dieron positivo para 3 casos (figura 10).

El valor de corte se calculó con el promedio de los suero negativos \pm 2 desviaciones estándar (Zumaquero *et al.*, 2012).

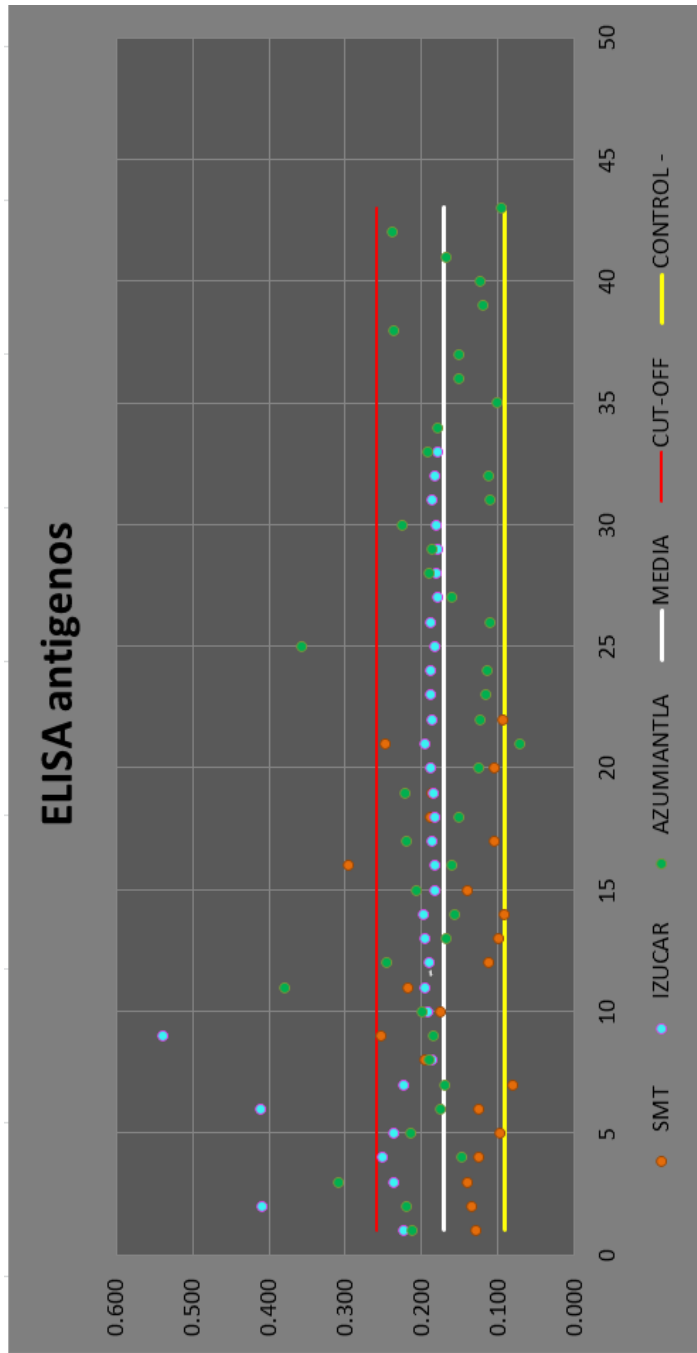


Figura 10: En este grafico se muestra las densidades ópticas obtenidas en la prueba de inmunodiagnostico ELISA para antígeno, para las muestras obtenidas en las tres localidades, se considera positivo todos los valores que estén por encima del valor de corte (0.259-0.081)

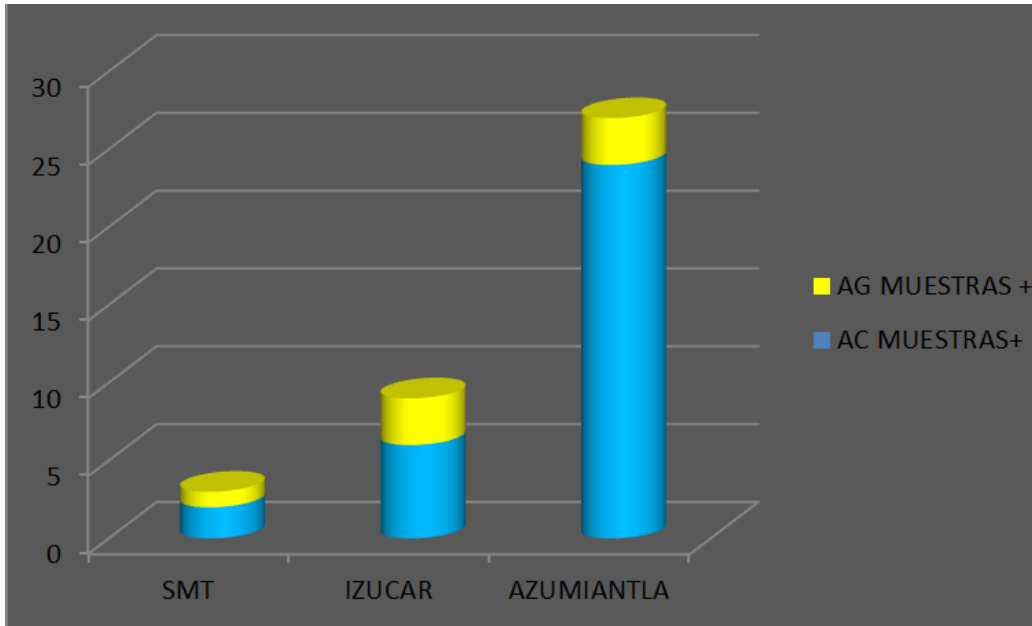


Figura 11.- Prevalencia de casos positivos de anticuerpos y antígenos en sueros de cerdo

La prevalencia de anticuerpos por zona para cerdos es para San Martín Texmelucan de 4.29% de casos positivos, para San Andrés Azumiatla, es del 43.55% y en Izúcar de Matamoros es de un 9% de seroprevalencia

La prevalencia de antígenos por zona es para San Martín 1.43% de casos positivos, para Izúcar de Matamoros, es del 3% para los casos positivos y en San Andrés Azumiatla es de un 4.84% de casos.

PREVALENCIA		
LOCALIDAD	AC	AG
SAN MARTIN	4.29%	1.43%
IZUCAR	9.00%	3.00%
AZUMIATLA	43.55%	4.84%

Tabla 3.- Prevalencia de casos positivos de anticuerpos y antígenos en sueros de cerdo

Se utilizó el índice kappa de Cohen para obtener el grado de concordancia entre los casos positivos de anticuerpos y antígenos.

Obteniendo grados de concordancia discretos para San Martín Texmelucan e Izúcar de Matamoros y un grado de concordancia insignificante para San Andrés Azumiatla

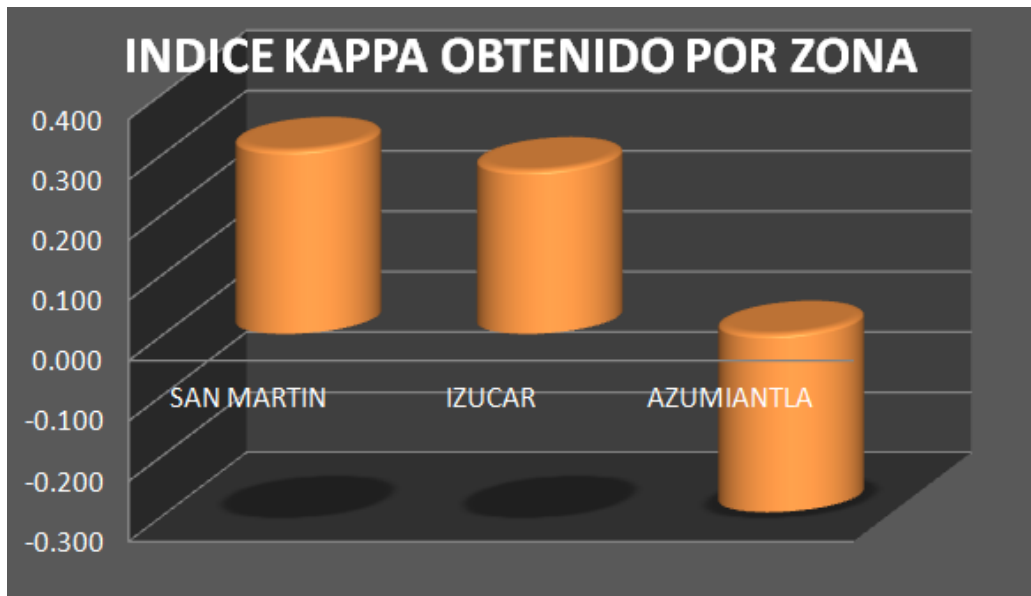


Figura 12.- Comparativa de índices Kappa

INDICE	KAPPA
LOCALIDAD	
SAN MARTIN	0.305
IZUCAR	0.271
AZUMIATLA	-0.296

Tabla 4.- resultados de índices Kappa



7. DISCUSIÓN

Sobre el número de muestras de suero (tabla 3), en total se colectaron 232, de los cuales se obtuvieron 39 positivos para anticuerpos y 7 para antígenos.

La dilución de sueros utilizada para la prueba de ELISA contra anticuerpos de *T. spiralis* fue 1:50 (10 microlitros de suero y 490 microlitros de PBS Tween).

La dilución de sueros utilizada para la prueba de ELISA detección de antígenos de *T. spiralis* fue 1:4 (25 microlitros de suero y 72 microlitros de PBS Tween).

Se obtuvo un valor de corte la prueba de ELISA contra anticuerpos de *T. spiralis* en suero porcino de 0.599-0.034, de igual forma se obtuvo un valor de corte la prueba de ELISA para detección de *T. spiralis* en suero porcino de 0.259-0.081 siguiendo el protocolo establecido por Zumaquero *et al.*, 2012.

En reportes hechos en el 2000 por Flores & Moreno en los estados de Zacatecas, Durango Chihuahua, Guanajuato, Jalisco, Estado de México y Distrito Federal se ha registrado brotes epidémicos de triquinosis ,en el 2010 se les encontró a *Trichinella* en el estado de Oaxaca donde se creía extinto en dicho estado (promed mail neglected disease



05/07/2010), y hasta la fecha no existían reportes para el estado de Puebla, en el presente estudio se detectó por primera vez para el Estado de Puebla la presencia de antígenos, y anticuerpos de *T. spiralis* en suero de *Sus Scrofa* (cerdo) provenientes de diferentes puntos del estado (San Andrés Azumiantla, Izucar de matamoros, Sn. Martin Texmelucan) lo cual pone en evidencia que el parásito está presente en la población de cerdos distribuidos para el consumo humano en el estado ya sean criados en traspatio o en granjas establecidas.

La detección de *Trichinella spiralis* actualmente suele realizarse en su mayoría por técnicas post-mortem como la triquinoscopia aunque su sensibilidad se ve afectada ya que depende de la cantidad de tejido examinado y el lugar en el cual se ha obtenido la muestra, esto se debe a que la prueba depende significativamente de la intensidad parasitaria y de la etapa en que se encuentre el parásito y es una técnica poco eficiente (entre el 2% y 3% de eficiencia Moreno (2007 y 2009), Ogunniyi *et al.*,(2014),sin embargo se sigue realizando esta técnica, debido a que esta normada por el reglamento de rastros de México (Reglamento de rastros, Art 5 sec. XV).

La detección de anticuerpos y antígenos hace una fácil detección de la infección y mucho más certera que la ya que cada una de estas pruebas permite una detección del parasito de una forma indirecta mediante la localización ya sea de antígenos o anticuerpos, los cuales llegan a presentarse en alguna las dos etapas de la infección, siendo la detección de antígenos la primera en poder ser utilizada, ya que estos son los únicos presentes durante la fase aguda o primera fase y el uso



de un anticuerpo monoclonal para la detección de antígenos de *Tricinellosis* le adiciona una mayor sensibilidad a la prueba.

Los resultados coinciden con Molina *et al.*, (2012), en que las pruebas inmunológicas, poseen alta eficiencia y un alto grado de sensibilidad, aún ante una infección baja comparándolas con la triquinoscopia ya que esta última puede dar falsos negativos y esto no indica la ausencia del parásito (Peña, 2001) además de que esta se puede usar en animales vivos sin ser invasiva para el ejemplar, además de que muestra una mayor sensibilidad comparado con las pruebas directas por ejemplo la triquinoscopia y digestión enzimática (Recavarren *et al.*, 2014)

Los síntomas iniciales de la infección son similares con los de 50 enfermedades aproximadamente, por lo que contar con un método de diagnóstico específico durante los estadios iniciales se hace de gran importancia médica.

El diagnóstico de la parasitosis es importante y de igual forma la prevención de ella con un aumento de rigor para las reglas de sanidad de los rastros, evitando que llegue la carne infestada al consumo humano y darle difusión a la gente de que la infección está latente en el estado.

Se propone adicionar al control de sanidad de los rastros la técnica de digestión artificial por su bajo costo y proporcionar una mayor aproximación al número de larvas presentes en la carne y derivados como lo demuestra Scialfa *et al.*, (2014), además de que se puede utilizar en carne fresca y productos procesados infestados como demuestra Bolpe *et al.*, (2013).



En cuanto se analizó la prevalencia de la enfermedad para anticuerpos se pudo observar que su valor es mayor, en la localidad de San Andrés Azumiatla 43.53%, en los cerdos provenientes del municipio de Izucar de Matamoros 9%, en el caso de cerdos muestreados de criaderos establecidos institucionalmente que llegan al rastro de San Martín Texmelucan con 4.29% de prevalencia. Todo esto muestra un aspecto de importancia epidemiológica pues la mayor cantidad de carne sale de estos centros para el consumo humano y la elaboración de subproductos cárnicos de igual forma existe en estos centros gran cantidad de roedores que conviven y pueden ser ingeridos por los animales si se toma en consideración los hábitos alimentarios de *Sus scrofa*. Este estudio demuestra de forma indirecta la necesidad de mejorar las técnicas de inspección de los productos cárnicos pues sin duda en humanos debe existir una prevalencia importante, dado el consumo alto de carne fresca de cerdo y sus subproductos en todo el territorio poblano y en México en general.

Por otro lado al analizar los resultados de antígenos la prevalencia más el municipio de Azumiatla obtuvo 4.84% positivos y la localidad de Izucar 3% y los cerdos de rastro de San Martín Texmelucan con un 1.43% positivos, no obstante, al ser comparados con otros estudios en zonas de prevalencia alta como son los brotes de Azul y San Luis reciente acontecidos en Argentina se observa una prevalencia superior debido a que estos estudios no son practicados en este país y solo la digestión enzimática y detección de anticuerpos constituyen las formas de diagnóstico (promed mail neglected disease 15 -06/2015)



La detección de antígenos pudiera permitir tanto en cerdos como en humanos tratamientos eficaces en una infección temprana que permitiría evitar casos que evolucionen de forma desfavorable

Aunque los cerdos sacrificados en un rastro establecido, los animales tienen una baja prevalencia de infección si se comparan con Buenos Aires (0.01 a 0.03%) causa un alarma ya que hay una gran diferencia esto demuestra que las medidas de sanidad son deficientes en dichos establecimientos, no obstante la fuente que tiene mayor potencial en cuanto a infectar humanos son los cerdos criados en traspatio, ya que tienen un mayor riesgo de contagio dado que la forma en la que son alimentados (desperdicio de comida) y a que atraen a roedores como las ratas, además de que no cuentan con un control veterinario adecuado.

Al analizar los índices kappa obtenidos vemos que no hay relación entre los casos positivos de anticuerpos con los casos positivos de antígenos de acuerdo con el método utilizado por Cerda & Villarroel (2008) ya que el que estén positivos para anticuerpos no quiere decir que tengan la enfermedad latente ya que se debe esto a que estuvo en contacto con el paracito tiempo atas (anticuerpos de memoria de memoria) o bien se encuentra latente la enfermedad en los cerdos analizados, como lo sugiere Condori López (2011).

8. CONCLUSIÓN

La técnica ELISA para detectar Antígenos de *Triquinella spiralis* en sueros de cerdo ha demostrado ser una herramienta inmunológica de gran desempeño y eficaz para confirmar la presencia de Antígenos en suero de cerdo, esta técnica viene a complementar el diagnóstico parasitario en la fase aguda de la parasitosis ya que para la fase crónica se ocupa la técnica ELISA para detección de anticuerpos que presenta una sensibilidad y especificidad. Sin embargo la detección de antígenos es la más indicada para poder ser utilizada primero, ya que los antígenos son los únicos presentes durante la fase aguda, la cual es la primera fase de la infección.

Se muestra la presencia de Antígenos de *Triquinella spiralis* y que la enfermedad está latente en cerdos de traspatio cuya carne es utilizada para consumo humano en el estado de Puebla.

Este es el primer reporte que se realiza para el estado de Puebla con la técnica ELISA para la detección de Antígenos de *Triquinella spiralis* en suero de (*sus scrofa*)



9.- BOBLOGRAFÌA

- Acha, P. (2003). Zoonosis Y Enfermedades Transmisibles Comunes Al Hombre Y A Los Animales. *Panamerican Health Org*, 580, 325-327.
- Barriga, O. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (Tercera edición III ed., Vol. No. 580 sección B 3). Washington DC: Publicación Científica y Técnica.
- Berrumen De la torre, V., Muñoz Escobedo, J., & Moreno Garcia, M. (2002). Trichinellosis en perros callejeros de la ciudad de Zacatecas Mexico. *parasitol latinoam*, 57, 72-74.
- Bolpe, J., Scialfa, E., Gallicchio, O., Ledesma, M., Benitez, M., & Aguirre, P. (2013). Triquinosis en la provincia de Buenos Aires: Alimentos involucrados en brotes de la enfermedad. *RAZyEIE*, VIII(1).
- Caballero García, M., Jiménez Cardoso, E., UribeGutiérrez, G., Trejo Hernández, E., & Gay Jiménez, F. (2005). Frecuencia de *Trichinella spiralis* en sangre y músculo de equinos. *Veterinaria México*, 36(003).
- Cabral Soto, J., Villicaña Fuentes, H., M. A. , H., M. S., P., M. S., P., Fragoso Uribe, R., & Contreras, A. (1990). Perfil epidemiológico del estado de Zacatecas. *Salud Publica Mex*, 32(5), 575-582.
- Caracostantogolo, & Martinez. (2009). Epidemiología de la trichinellosis y situación en la argentina. *Temas de zoonosis IV*, 26, 257.
- Carroll Faust, E., Farr Russell, P., & Clifton Jung, R. (1970). *Parasitología clínica*. México: Salvat.
- Cerda L., J., & Villarroel del P., L. (2008). Evaluación de la concordancia inter-observador en investigación pediátrica: Coeficiente de Kappa. *Rev Chilena Pediatría*, 79(1), 54-58.
- Chávez Guajardo, E. G., Saldivar Elías, S., Muñoz Escobedo, J. J., & Moreno García, M. A. (2006). Ttrichinellosis una zoonosis vigente. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, VII(5), 1-20.
- Chávez, G., Saldivar, S., Muñoz, E., & Moreno, G. (2006). Trichinellosis una zoonosis vigente. *REDVET*, VII(05), 1-19.
- Condori López, P. E. (2011). Relación antígeno- anticuerpo. *Revista de Actualización Clínica*, 13, 671-674.
- Correa, D., Coballase Urrutia, E., Solís Ríos, D., Huerta G, B., & Hernández Islas, J. (2006). apremdzaje de la parasitologia basado en prblemas. En A. Flisser steinbruch, & R. Perez Tamayo. mexico: Editores de textos Mexicanos.
- Crompton , D., & Savioli , L. (2010). Handbook of Helminthiasis . *Public*

- Health CRC Press*, 261.
- Darwin Murrell, K., & Pozio, E. (2011). Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2194-2202.
- De La-Rosa, J. I., Moran, F., Medina, Y., Gomez, A., & Correa, D. (Junio de 2001). Detection of circulating and fecal *Trichinella spiralis* antigens during experimental infection using monoclonal antibodies against the newborn larvae. *Parasite*, 8, 123-128.
- Fabregas, X., & Benito, J. (2001). *Trichinella*: epidemiología y nuevas perspectivas de inspección sanitaria en carne de equino. *Euorocarne*, 94.
- Flores Cardenas, G., & Moreno Garcia, M. (2000). Detección de *Trichinella spiralis* por DOT-ELISA en sueros de cerdos. *revista latinoamericana de Microbiología*, 24-II, 100-1.
- Fragoso, R., Tavizon, P., & Villacaña, F. (1981). Un brote de Triquinelosis en la laguna se carretero, Zacatecas. *Salud Publica Mexico*, XXIII, 25-41.
- Franco Sandoval, L., Caballero García, M., Rebeles Hernández, G., Moreno García, M., & Jiménez Cardoso, E. (Junio de 2012). Molecular similarities and differences between *Trichinella* spp., isolated from. *Experimental Parasitology*, 131-2, 148–152.
- Gajadhar, A. A., Pozio, E., Ray Gamble, H., Nöckler, K., Maddoxhyttel, C., B. Forbes, L., . . . Boireau, P. (2009). *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Veterinary Parasitology*, 159, 197–205.
- García Moreno, B. (2003). Higiene e inspección de carnes. Madrid España: Ediciones diaz de santos, S.A.
- Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 127–145.
- Gracey, J., Collins, D., S., & Huey, R. (1999). Meat Hygiene. *W.B. Saunders, 10th edition*, London.
- Jovic, S., Djordjevic, M., Kulisic, Z., Pavlovic, S., & Radenkovic, B. (2001). Infectivity of *Trichinella spiralis* larvae in pork buried in the ground. *Parasite*, 8, 213-215.
- Kotula, A., Murrell, K., Acosta-Stein, L., Lamb, L., & Douglass, L. (1983). *Trichinella spiralis*: effect of high temperature on infectivity in pork. *Exp Parasitol*, 56(1), 15-19.
- Krivokapich, S. J., Pozio, E., Gatti, G. M., Gonzalez Prous, C. L., Prous, G., Ribicich, M., . . . Confalonieri, V. (2012). *Trichinella*



- patagoniensis n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species. *International Journal for Parasitology*, 42, 903-910.
- Malakauskas, A., & Kapel, C. M. (2003). TOLERANCE TO LOW TEMPERATURES OF DOMESTIC AND SYLVATIC TRICHINELLA SPP. IN RAT MUSCLE TISSUE. *Journal of Parasitology*, 89(4), 744-748.
- Maldonado Tapia, C. H. (2007). *EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DEL INMUNOGENO*. NUEVO LEON: Tesis de Doctorado UANL Mexico.
- Mariana Inès, R., Quintana, S., Krivvokapich, S., Scialfa, E., Viera, I., & Di Gerònimo, V. (2014). Diagnòstico molecular de Trichinella spiralis en muestras de suero de porcinos. *SNS Publicaciòn periodica científico-tecnologica*, 60-63.
- Molina, V., Albarracín, S., Krivokapich, S., Chiosso, , Mancini, S., Bigatti, R., . . . Avila, A. (2012). Seroepidemiología y control de trichinellosis en cerdos en Sierra Grande, Argentina. *InVet*(140), 33-40.
- Moreno García, M., Escobedo, J., Reveles Hernández, R., Saldívar, E., & De La Torre Vació, M. (2012). *Utilización de técnicas directas e indirectas en el diagnostico de trichinellosis en cerdo*. Universidad Autonoma de Zacatecas, Unidad de Biología celular y micribiología .
- Moreno García, M., Maldonado Tapia, C., García Mayorga, E., Reveles Hernández, R., & Muñoz Escobedo, J. (2009). Fase intestinal de Trichinella spiralis en modelo murino. *Acta.Biol.*, 1(14), 203 -210.
- Moreno, A., & Muñoz, J. (1993). Características De La Respuesta Inmune Trichinella spiralis. *Investigación Científica*, 1, 17-28.
- Ogunniyi T., T., Balogun, H., & Shasanya, B. (2014). Ectoparasites and Endoparasites of Peridomestic House-Rats in Ile-Ife, Nigeria and Implication on Human Health. Iranian. *J Parasitol*, 9(1), 134-140.
- OIE. (2012). Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines. Chapter 2.1.16. Trichinellosis.
- Ortega-Pierres. (1995). La caracterizacion de los antígenos de superficie del nematodo parásito Trichinella spiralis: estudio de su participacion en los mecanismos de proteccion y su utilidad en el diagnostico de la triquinosis. *Gaceta Medica Mexico*, 131(1), 2-13.
- Ortega-Pierres, M., Arriaga, C., & Yépez-Mulia, L. (2000). Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central. *Veterinary Parasitology*, 93(1), 201–225.
- Peña, M. T. (2001). .Técnicas de diagnóstico de Trichinella spiralis Red



- de Helminología de FAO para América Latina.
- Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G., & Zarlenga, D. (2009). Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 606–616.
- Ramírez Valenzuela, M. (1981). Epidemiología de la Triquinelosis. *Ciencia Veterinaria*, III, 277-334.
- Reveles Hernández, R. G., Saldivar Elías, S. J., Muñoz Escobedo, J. J., Maldonado Tapia, C., & Moreno García, M. A. (2011). An assessment of *Trichinella spiralis* infection in gonadectomized pigs in Zacatecas, Mexico. *Acta Med Peruana*, 28(4), 211-216.
- Ribicich, M., Gamble, H., Bolpe, J., Scialfa, E., Krivokapich, S., Cardillo, N., . . . Rosa, A. (2010). *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitol Res*, 107, 377–380.
- Sandoval Franco, L., García Mde Caballero, Moreno García, M., & Jiménez Cardoso, E. (2012). Molecular similarities and differences between *Trichinella* spp., isolated from canine skeletal muscle in Zacatecas, Mexico. *Exp Parasitol*, 131(2), 148-152.
- Schad, G., Duffy, C., Leiby, D., & Murrell, K. (1987). *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission under natural and experimentally modified on-farm conditions. *J. Parasitol*, 73, 95–102.
- Scialfa, E., Aguirre, P., Passucci, J., Rodriguez, E., Gallicchio, O., San Anton, D., & Ledesma, M. (2014). Comparación de dos técnicas para la detección de larvas de *Trichinella spiralis* en muestras de carne fresca de cerdo, embutidos y salazones. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Emergentes*, IX(1), 18-21.
- SEGOB, S. (1989). *Reglamento de rastros. Artículo 5 sección xv.* publicado en el suplemento al periódico oficial número 4912.
- Stojcevic, D. Z. (2004). The epidemiological investigation of *Trichinella* infection in brown rats (*Rattus norvegicus*) and domestic pigs in Croatia suggests that rats are not a reservoir at the farm level. *J Parasitol*, 90(3), 666-670.
- Voller, A. (1978). The enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.) . *W.H.O.*, 2(1).
- Zavala, J., Sánchez Vega, J., Ruiz Sánchez, D., Calderon Romero, L., García Yañes, Y., Alonso, T., . . . Rivas, C. (2004). Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinelosis en la república mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas. *G Rev Fac Med UNAM*, 3, 47.
- Zumaquero Ríos, J., García, J., De La Rosa, J., Marcet, R., & Sarracent



Pérez, J. (2012). *Trichinella spiralis* : Monoclonal antibody against the muscular larvae for the detection of against the muscular larvae for the detection of circulating and fecal antigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology*, 132, 444-449.

10.-ANEXOS

Materiales:

- Placas de ELISA (marca comercial Nunc) Núm. De catálogo 468667 o 469949
- Micropipetas variables de 2- 20 μ l, 20-200 μ l.100-1000 μ l.
- Pipetas pasteur plásticas
- Balanza analítica
- Lector de micro-ELISA, filtro 490nm (ELISA BIO-TEK instruments, Inc)
- Computadora
- Centrifuga (HERMILE Z360K)
- Estufa de cultivo

Soluciones:

- Solución de Recubrimiento, pH 9.6 :
1.59 gr de Carbonato de Sodio, 2.93 gr de Bicarbonato de Sodio, aforar a 1lt con agua destilada.
- Solución de Bloqueo:
2gr de Albumina de Suero bobino (BSA), disolver en 100ml de solución de recubrimiento, (conservar en congelación)
- PBS pH 7.7 – 7.4:
8 gr de Cloruro de Sodio, 0.2gr de Fosfato Monobásico de Potasio, 1.28 gr de Fosfato dibásico de Sodio, 0.2 gr de Cloruro de Potasio. Aforar a 1Lt con agua destilada. Conservar a 4°C
- Solución de Lavado:
0.5 ml de Tween 20 por Litro de PBS (usar agitador magnético)
- Buffer de sustrato pH5:
24.3 ml de Ácido Cítrico al 0.1 M, 25.37 ml de Fosfato dibásico de Sodio al 0.2 M, aforar a 50 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.



- Solución para detener la reacción (Stop):
Ácido sulfúrico al 12.5% Normal.
- Disolución del conjugado anti ratón:
Diluir 1 μ l de conjugado DAKO anti inmunoglobulinas en ratón por 1 ml de solución diluyente.
- Solución Diluyente:
50 ml de PBS Tween por 1 gr de BSA:
- Disolución de Proteína G:
Diluir 1 μ l de conjugado de proteína G con concentración 1-1000 en 1ml de Solución diluyente. (Diluir solo cuando este por emplearse)
- Solución de sustrato:
9 ml de agua destilada, 1 ml de Bufer de sustrato Ph 5 y una pastilla de 5mg de o- Fenilendiamina Dihidroclorido (diluir solo cuando este por emplearse)
- Disolución de Anticuerpo monoclonal:
Diluir 2 μ g de anticuerpo monoclonal por 1ml de solución diluyente.