



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Inmunodiagnóstico de *Trichinella spiralis* Owen 1838
(Nemata Adenophorea) y otros parásitos en roedores
sinantrópicos, Mercados del estado de Puebla, México**

Tesis para obtener el título de:

BIÓLOGO

PRESENTA:

P.B Luis Raúl Angulo Cruz

200705699

TUTOR: Dr. José Lino Zumaquero Ríos

Agosto de 2014



INDICE

Introducción

| | |
|--|-----------|
| Ciclo de vida..... | 1 |
| Ciclo de transmisión..... | 2 |
| Distribución y especies del género Trichinella..... | 4 |
| Antecedentes..... | 7 |
| Objetivos | |
| General..... | 10 |
| Particulares..... | 10 |
| Justificación..... | 11 |
| Material y Métodos | |
| Área de estudio..... | 12 |
| Muestreo y captura..... | 13 |
| Manipulación de los ejemplares | 14 |
| Toma de muestra..... | 14 |
| Técnica de ELISA..... | 14 |
| Triquinoscopía..... | 15 |
| Identificación de helmintofauna intestinal..... | 15 |
| Resultados..... | 16 |
| Discusión..... | 21 |
| Conclusión..... | 25 |
| Referencias..... | 26 |
| Anexos..... | 31 |

Introducción

La rata negra, o rata de los desagües *Rattus rattus* (Linnaeus.1758) y la rata de los tejados o rata de noruega *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) son dos vertebrados que transmiten enfermedades al humano (Lannaconce y Albariño, 2002). Los roedores sinantrópicos son considerados reservorios de muchas enfermedades y entre su helmintofauna parasitaria se ha encontrado a los géneros: *Syphacia*, *Trichuris*, *Toxocara*, *Hymenolepis*, *Ascaris*, *Trichinella* entre otros, como parásitos intestinales de roedores (Vives y Zeledón, 1957; Lannaconce y Albariño, 2002; Ogunniyi y Balogun et. al. 2014). Cabe destacar que entre estos parásitos, *Trichinella spiralis* es considerada una de las especies de nemátodos más importantes que parasitan al hombre (Camet, 2000). En los últimos años se han notificado varios casos de triquinelosis en América debido al hábito y frecuencia del consumo de carne de cerdo, aunque en la antigüedad se prohibía el consumo de carne de cerdo porque en la cultura judía y en la musulmana este animal se consideraba inmundo. *Trichinella spiralis* ya era conocido por la especie humana; se encontró en músculos de la momia de un joven que vivió en Egipto en el año 1200 a. c; se cree que varias epidemias descritas en la historia se debieron a este parásito (Flisser y Tamayo, 2006). En la época actual se puede afirmar que la triquinelosis en el hombre moderno no ha sido erradicada y es considerada una enfermedad cosmopolita con tasas de mortandad bajas y decrecientes (Moreno et. al, 2007; Barriga, 2003).

De las 32 especies de nemátodos que parasitan al hombre se destaca a este parásito como la más peligrosa (Owen, 1835; Valenzuela, 1981).

Ciclo de vida

Los parásitos del género *Trichinella* son organismos intracelulares obligados, sexuados, con ciclo de vida directo, pues sus tres estadios (Adulto, Larva Recién Nacida LRN y Larva Infectante LI) ocurren en un solo hospedero (Flisser y Tamayo, 2006; Barriga, 2003; Moreno et. al, 2009).

Su ciclo de vida ocurre en dos fases, la entérica llevada a cabo a nivel de yeyuno e íleon y la parenteral. Durante esta fase el hospedero potencial contrae la triquinosis al consumir carne infectada con LI, en el estómago, las LI son liberadas por acción de enzimas digestivas y transportadas pasivamente por peristalsis a las dos terceras partes del intestino delgado. El parásito que entra mide aproximadamente 1 mm de largo, el cual sufre cuatro mudas tomando un periodo de 30 horas para su desarrollo (tamaño del macho 1.5mm y hembra 3mm). *T. spiralis* está dentro de un nicho intramulticelular, ocupando la hembra de 415-450 células y el macho de 140-152 células, los machos ocupan una hilera de células adyacentes a las que ocupa la hembra y la copula se da en el nicho intramulticelular entre las 37 y 40 horas pos infección (cada macho puede fecundar 2 hembras). Posterior a esto, los machos mueren y son expulsados, la hembra aumenta de tamaño y penetra más profundamente en la mucosa intestinal (la embriogénesis dura 90 horas).

Este organismo se considera ovovivíparo y cada hembra da origen de 60-80 Larvas Recién Nacidas (LRN). Durante la fase parenteral las LRN se introducen en la lámina del intestino y llegan a la circulación arterial a través del conducto torácico, finalmente invaden los músculos, principalmente diafragma, lengua, laringe, bíceps y musculo lumbar. Veinte días posteriores a la penetración se desarrolla el esticosoma y se pueden identificar los sexos (Flisser y Tamayo, 2006; Moreno et al. 2009).

La larva se hace infectante para el próximo huésped alrededor del día 16 desde la invasión del musculo, casi todas las especies forman un quiste y este puede permanecer estable durante toda la vida del hospedero o calcificarse, y una vez que es ingerida el ciclo vuelve a comenzar (Flisser y Tamayo, 2006. Barriga, 2003).

Ciclo de transmisión

La triquinosis en la naturaleza es una infección de los animales silvestres, el parásito circula entre animales carnívoros predadores y animales omnívoros o necrófagos. Los primeros se infectan cazando a los segundos, y estos se infectan

comiendo los cadáveres de los primeros. Desde el punto de vista epidemiológico es importante la resistencia del parásito a la putrefacción; en carnes en avanzado estado de descomposición se han encontrado larvas vivas, y a menudo infectantes, por un período de hasta cuatro meses, lo que facilita la infección de los que comen carroña. De este ciclo silvestre se deriva un ciclo doméstico, peridoméstico o sinantrópico que ocurre cuando animales sinantrópicos como ratas, perros, gatos y cerdos se infectan por consumo de animales silvestres (Barriga, 2003). 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, 2001; Flisser y Tamayo, 2006).

Por sus interacciones de comedores de carroña, coprofagia y depredación las especies más afectadas corresponden a los carnívoros, que constituyen una fuente importante de infección para la especie humana. Los roedores son un importante vínculo entre la epidemiología silvestre y el ciclo doméstico de infección, debido a varios factores como el canibalismo elevado y que más de 20 especies de estos son hospederos de este parásito, además son considerados una especie reservorio (Valenzuela, 1998; Takumi, 2010; Berenguer, 2007; Moreno 2009; Barriga, 2003).

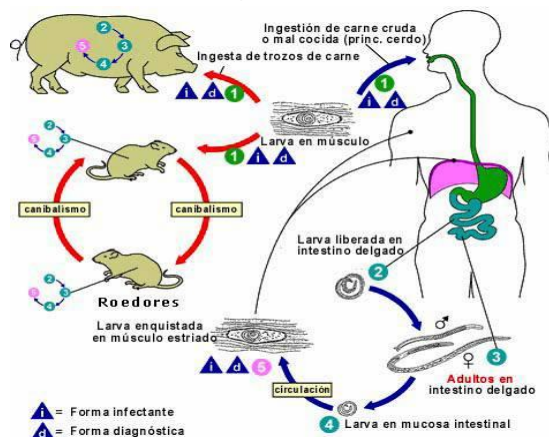


Figura 1: Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*; la larva infectante (LI) enquistada en músculo es consumida por algún carnívoro, y posteriormente concluye su desarrollo en su nuevo hospedero, en el caso de la rata esta puede ser ingerida por los cerdos y estos pasar la infección al hombre (Moreno et. al. 2003)

Distribución y especies del género *Trichinella*

Durante mucho tiempo se pensó que *T. spiralis* era una sola especie, tiempo después, el trabajo detallado de Pozio et. al. (2009), señala un total de 7 especies diferentes para este género; *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae*, *T. nativa*, *T. nelsoni* y *T. murelli* (Barriga, 2003; Flisser y Tamayo, 2006). A continuación se detalla la importancia de las especies más relevantes:

T. spiralis se la encuentra en ciclos epidemiológicos domésticos, peridomésticos y silvestres. Es altamente infectante para el ratón, la rata, el cobayo, el conejo y el cerdo; moderadamente para el hámster y no infecta a las aves. Esta especie es altamente patogénica para el ratón y la rata y moderadamente patogénica para el hombre. En el músculo, la larva no sobrevive más de 10 o 20 días a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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. La larva sobrevive en el músculo 6 o más meses a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ y es resistente a las temperaturas elevadas.

T. pseudospiralis circula entre predadores de aves y sus presas. Es altamente infectante para el hámster, levemente para las ratas, 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 $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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*. (Barriga, 2003; Flisser y Tamayo, 2006)

La triquinelosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, aunque hay zonas en las que no se ha observado el parásito. No obstante la distribución de las distintas especies es discreta. *Trichinella spiralis* está adaptada a zonas templadas y se considera cosmopolita, mientras que *Trichinella britovi*, también se encuentran en áreas templadas, aunque solo se ha reportado en Europa. La localización de *T. pseudospiralis* es bastante amplia, pues se localiza en Europa, India, el norte de EUA, y Oceanía. *Trichinella nativa* es una especie localizada exclusivamente en regiones árticas y sub-árticas. En contraste *Trichinella nelsoni* y *Trichinella zimbabweiensis* se encuentran en la región africana subsahariana y *Trichinella papuae* en Nueva Guinea, los grupos genéticos T5, T6 y T8 tienen una localización discreta. (Flisser y Tamayo, 2006).

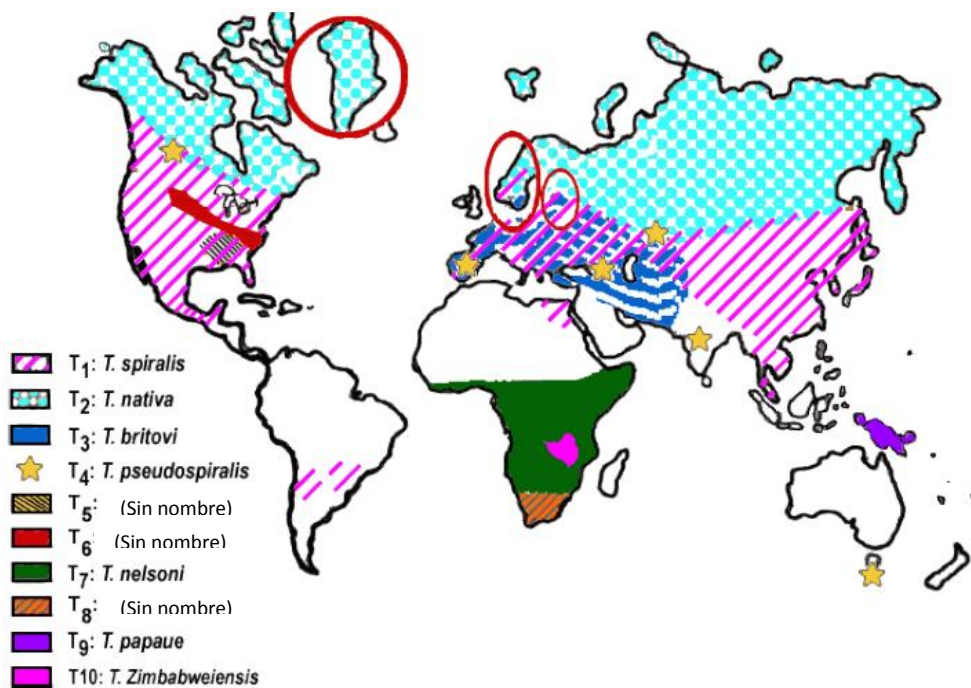


Figura 2: Mapa de la distribución del género *Trichinella* (Flisser y Tamayo, 2006).

En México la investigación epidemiológica relacionada con la triquinelosis, 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 larvas del parásito *Trichinella sp* infectan, cerdos, ratas, humanos y otros animales, y podrían causar la muerte, en casos de infecciones muy severas y falta de tratamiento oportuno (Gracey et. al.1999; Barriga, 2003).

En el presente estudio se analizaron muestras de sangre, tejido diafragmático, y contenido intestinal de roedores sinantrópicos capturados en el mercado Zapata y mercado Domingo Arenas de San Martín Texmelucan, ubicados en el estado de Puebla, con la finalidad de detectar la presencia de este nemátodo e identificar la helmintofauna intestinal.

Antecedentes

La triquinelosis ha sido reportada en varios países como Argentina, Canadá, Chile, Bulgaria, Francia, Grecia, Irlanda, Italia, Rusia, Rumania, Japón, Vietnam y México entre otros (Camet, 2000; Murell y Poizo, 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 México, el primer reporte de la enfermedad fue gracias al trabajo del Dr. Manuel Toussaint Varga, quien a finales del siglo XIX encontró el parásito en una muestra de músculo diafragmático donada por el Dr. Miguel Zúñiga (Barragán, 1893). Algunos de los trabajos realizados en México entre 1939 y 1953, fueron recopilados en el trabajo de Mazzoti (1953) del cual a continuación se muestra una recapitulación en la figura 3:

| Autores | Año | Sujeto infectado | Lugar |
|--------------------------|------------|-------------------------|------------------|
| Perrin J. | 1939 | Humano | Distrito federal |
| Mazzotti C. y Chavira L. | 1943 | Humano | Estado de México |
| Núñez y Mazzotti | 1948 | Gato | México |
| Beck Walter J. | 1953 | Humano | Estado de México |

Figura 3: Trabajos sobre triquinelosis realizados en México en el siglo XIX (Mazzoti, 1953)

Las infecciones por este parásito en cerdos, perros, gatos y ratas han sido reportadas en varios estados de México como: Zacatecas, Michoacán, Distrito Federal, Durango, Jalisco, Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Colima, San Luis Potosí, Hidalgo, Chihuahua, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Sonora (Ortega et. al. 2000).

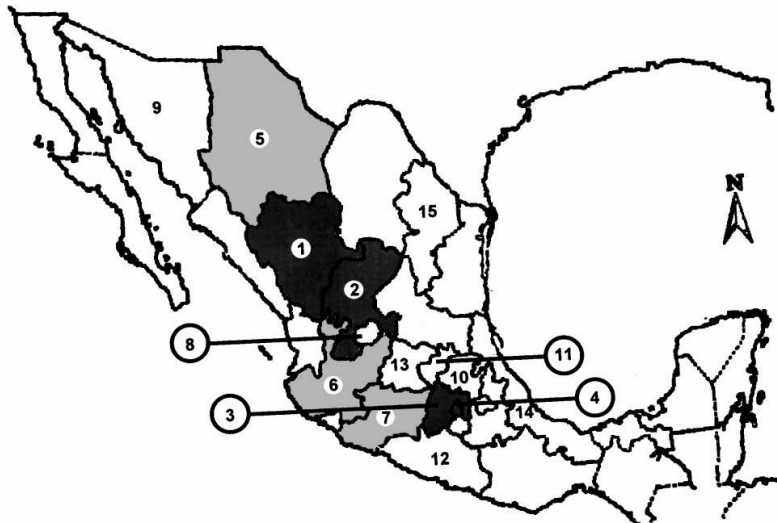


Figura 2: Estados de México donde ha sido reportado casos de triquinelosis. Estados con gran incidencia (●) incluye: Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México(3), Ciudad de México (4); estados con incidencia media (●) incluyen: Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); estados con baja incidencia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

En México a finales del siglo XIX, la revista electrónica de veterinaria (REDVET), reportó entre 1991 y 1995, un total de 282 cerdos infectados con *Trichinella spiralis* (Chávez y Saldivar et. al. 2006) y en el año 2000 se menciona que entre los años 1991 -1995 se detectaron 256 casos de triquinelosis en cerdos (Camet, 2000); además entre los años 1986 y 2001 se han reportado 351 casos de esta enfermedad en humanos (Pozio y Darwin, 2011).

En el municipio de Zacatecas 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) y 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).

En el estado de México, se detectó la presencia de *T. spiralis* en equinos de mataderos industriales y rurales. Por técnicas directas e indirectas, 3.75% de 100 individuos fueron positivos a este parásito (Jiménez, Caballero et. al. 2005).

De los estados de México con mayor número de trabajos referentes a triquinelosis, Zacatecas es el más destacado. El primer brote fue registrado en 1976 en el municipio de Villanueva, con 8 defunciones y seis años después Del Río et. al. (1984) encontraron 8 diafragmas positivos en 51 cadáveres analizados. En años posteriores Berumen et. al. (2002) analizaron 51 lenguas de perros por técnicas directas (digestión artificial y triquinoscopía) e indirectas (Inmunológica de microinmuno difusión doble), donde el 5.8% de los casos analizados son positivos a la presencia de *T. spiralis* por técnicas indirectas y en las técnicas directas no obtuvo positividad; Moreno et. al. (2007), analizaron 100 muestras de diafragma, 100 de suero sanguíneo, y 100 intestinos de roedores capturados en el basurero municipal y obtuvieron positividad en 6 casos. Cuatro años después 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.

Objetivos

General

- Determinar la presencia de *Trichinella spiralis* y otras parasitosis en roedores sinantrópicos en los mercados “Zapata”, municipio Puebla, Pue y mercado “Domingo Arenas”, municipio de Sn. Martin Texmelucan, Puebla.

Particulares

- Determinar la presencia de antígenos y anticuerpos de *Trichinella spiralis* en suero sanguíneo de roedores sinantrópicos capturados en los mercados “Zapata”, municipio Puebla, Pue y mercado “Domingo Arenas”, municipio de Sn. Martin Texmelucan, Puebla.
- Identificar la presencia de *Trichinella spiralis* en músculo diafragmático por triquinoscopía en roedores sinantrópicos capturados en los mercados “Zapata”, municipio Puebla, Pue y mercado “Domingo Arenas”, municipio de Sn. Martin Texmelucan, Puebla.
- Determinar la presencia de helminto fauna parasitaria intestinal en roedores sinantrópicos capturados en los mercados “Zapata”, municipio Puebla, Pue y mercado “Domingo Arenas”, municipio de Sn. Martin Texmelucan, Puebla.

Justificación

La triquinelosis es una enfermedad que afecta al humano, varios brotes se han asociado a la ingesta de carne de cerdo y a sus subproductos en el mundo.

En los últimos años se han notificado varios casos de triquinelosis debido al hábito y frecuencia del consumo de carne de cerdo, la cual es una variable predisponente en la aparición de nuevos casos. Si se considera el comportamiento de esta variable, en la población mexicana, se requiere realizar un diagnóstico de la frecuencia de aparición de este nemátodo en roedores sinantrópicos, que son una especie reservorio y vínculo entre la epidemiología silvestre y el ciclo doméstico de la infección llegando a parasitar al ganado porcino al convivir y comer ambos en un mismo sitio.

No existe notificación de casos de triquinelosis en fase activa en el estado de Puebla, sin embargo son varias las entidades federativas del país que la han reportado. Es por ello que este estudio está encaminado a conocer si la triquinelosis circula entre las poblaciones de roedores asociados al humano en el estado de Puebla, ya sea por el consumo de carne de cerdo que no son inspeccionados en rastros, o aquellos que son sacrificados después de una crianza traspatio y llevados al consumo en los mercados con gran afluencia de la población.

Material y métodos

Área de estudio

El mercado Emiliano Zapata se encuentra ubicado en el municipio de Puebla, Pue, México, con coordenadas 19° 0'20.17" latitud norte, 98°13'0.68" longitud oeste a 2127 metros sobre nivel del mar, el clima del municipio es subtropical según la clasificación de Koppen, (Servicio Meteorológico Nacional). El área de estudio son mercados localizados en una zona urbana, con una higiene baja, que posee varios puestos de comida y carnicerías, donde se han avistado roedores.



Figura 4: Mapa de Puebla, Pue. (Google. INEGI 2015).

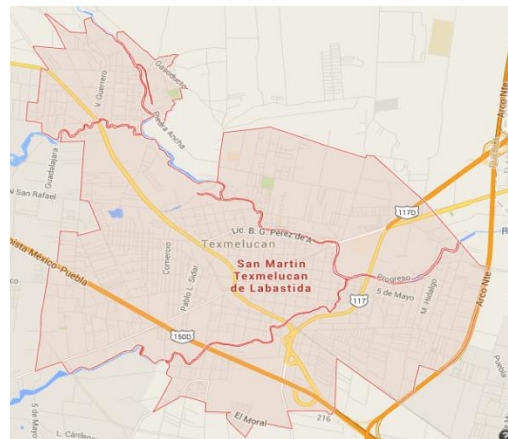


Figura 5: Mapa de San Martín Texmelucan. (Google. INEGI 2015).

La siguiente área de estudio se ubica en el mercado “Domingo Arenas”, municipio de Sn. Martín Texmelucan, con coordenadas 19° 16´59.2´´ latitud norte y 98° 25´24.2´´ longitud oeste a altitud a 2440 metros sobre el nivel del mar.

Muestreo y captura

En total se usaron 8 trampas y se colocaron por un periodo de 150 días. Las trampas se colocaron en las coordenadas que se muestran en el Anexo 1, se usaron trampas Tomahawk, las cuales se revisaron continuamente cada dos días por las mañanas. Previo a la colocación de las trampas se esparcieron diversos cebos cerca de la zona donde las trampas fueron colocadas, con el fin de mejorar la eficiencia del muestreo, (comunicación personal Dr. Martínez Vásquez Jesús).

Se utilizaron varios cebos para el estudio; como el citado en el “Manual de captura de mamíferos pequeños” (Martínez, Gonzáles et. al. 2010), a base de miel, vainilla y avena, embutidos, pescado y cereales entre otros (Anexo 2).

Todas las trampas se colocaron siempre en lugares con evidencia de presencia de roedores (avistamientos previos, nidos, excretas, zonas roídas o posibles refugios), como lo indica el “Manual de técnicas de captura de mamíferos pequeños” (Romero et. al. 2000), y las metodologías establecidas en el “Manual de recolecta de plantas y animales” (Martínez, Gonzáles et. al. 2010). Las trampas se colocaron por tiempo prolongado debido a la intensa actividad nocturna característica de los roedores y que los mismos se acostumbraran a la presencia de estas (Benavides y Gunét, 2003).

Se anotó en una bitácora diferentes datos de los roedores capturados, como sexo, lugar de captura, peso aproximado y alguna observación particular

Manejo de los ejemplares

La manipulación de los organismos se hizo con guantes de carnaza por seguridad, una vez capturados se colocaron en la cámara de gas letal con cloroformo de uno a dos minutos, cumpliendo el código de manejo de animales (Ernest et. al. 1993).

Toma de muestra

Los organismos capturados se trasladaron al laboratorio de parasitología de la escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La sangre fue extraída a través de punción cardiaca (Ciriaco, 1998), usando tubos Vacutainer rojos, con activador de coagulo. Los tubos fueron centrifugados a 2000rpm por 5 min para la obtención del suero. El mismo se recuperó con una pipeta Pasteur plástica y fue preservado en refrigeración a -20°C en un ultra congelador. Todas las muestras fueron debidamente etiquetadas con número de ejemplar, fecha y lugar de captura, para lo cual se utilizó un georreferenciador GPS.

Técnica de ELISA

Esta técnica 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 e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y será revelada con la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Voller, 1978).

La técnica EILSA se realizó en laboratorio de parasitología de la escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Las muestras de suero se analizaron con el uso de un juego de reactivos para la determinación de antígenos a través de un anticuerpo monoclonal. También se realizó la detección

de anticuerpos contra antígenos de excreción-secreción. Los reactivos para estos ensayos fueron proporcionados por el laboratorio de parasitología de la escuela de biología. Para la lectura de la reacción se usó un lector de placas ELISA de 96 pocillos, (Zumaquero et. al. 2012) detallada en el Anexo 3.

Triquinoscopía

Se tomó muestra de tejido muscular del diafragma (1g por muestra aprox.) de cada ejemplar, para analizar las muestras por triquinoscopía por compresión de placas (Fabregas, 2001; Lamberti et. al. 2000) la muestra de diafragma se colocó entre dos porta objetos, y se ejerció presión para expandir y comprimir el tejido, posteriormente se analizó al microscopio óptico con lente 4X y 10X.

Identificación de helmintofauna intestinal

La identificación del contenido intestinal, se analizó mediante la metodología descrita por Mc. Garry et. al. (2014), el intestino se ligó, removió y abrió en cajas Petri con solución salina (30ml), el contenido intestinal obtenido por este método, se sometió a técnica de análisis directo con tinción de lugol al 2%, y también por técnica de flotación de Willis (Anexo 4), descrita en el libro “Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico” (Thienpont, Rochette et. al.1986). Para la observación de las muestras, se empleó un microscopio óptico a lente 40X. Los parásitos fueron identificados con ayuda de claves de identificación de Owen (2010).

Resultados

Se capturaron 17 ratas, 5 machos (29.5%) y 12 hembras (70.5%), de las cuales el 90% estaban gestantes con un promedio de 8 crías por individuo; el peso promedio de los ejemplares fue de 200g. La mayoría pertenecientes a la especie *Rattus rattus*. Los demás ejemplares pertenecían a las siguientes especies: *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Sigmodum sp.*

Helmintofauna parasitaria intestinal

Por técnica de flotación de Willis se pudieron identificar huevos de varios Helmintos; *Trichuris muris*, *Syphacia murriss*, *Strongyloides sp* y *Capillaria sp.* La especie *Syphacia murriss* es la más abundante obteniendo hasta 8 huevos en un solo campo, y un promedio de 4 huevos por campo.



Figura 6: Huevos de *Syphacia murriss*.

Los ejemplares que dieron positividad a *Syphacia murrís* también presentaron huevos de *Trichuris muris* con un promedio de un huevo por campo.



Figura 7: Huevos de *Trichiuris muris*

También se detectó la presencia de un huevo de *Capillaria sp* en dos ejemplares de *Rattus rattus*.



Figura 8: Huevo de *Capillaria sp.*

El último análisis de contenido intestinal reveló un huevo por campo de *Strongyloides sp* en solo dos ejemplares.



Figura 9: Huevo de *Strongyloides sp*

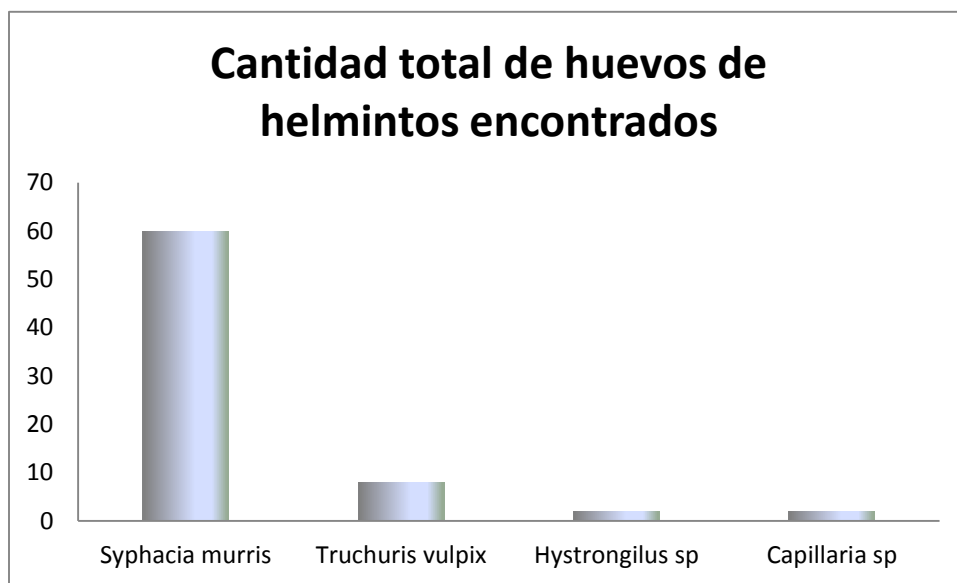


Figura 10: En este gráfico se muestra la cantidad total de huevos de helmintos encontrados por medio de la técnica de Willis, es evidente que *Syphacia murrís* es la más abundante.

Triquinoscopía

De los 15 diafragmas analizados, no se observó quistes de *T. spiralis*

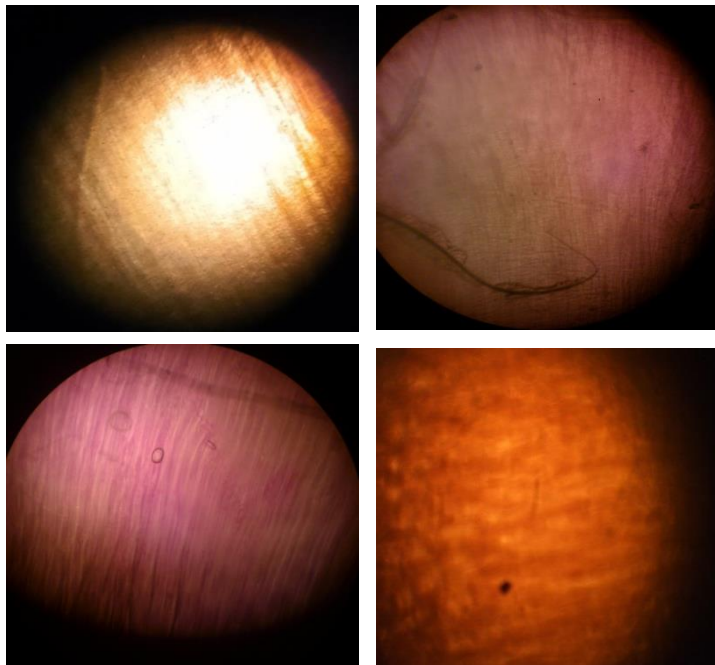


Figura 11: Imágenes de microscopía (4X) de triquinoscopías sin presencia de quistes de *T. spiralis*.

Determinación de antígeno y anticuerpo (ELISA)

Las pruebas de ELISA para detección de antígeno y anticuerpo dieron positivo para 5 casos, 3 de estos son fuertemente positivos para anticuerpo y 2 casos son positivos para antígeno. El valor de corte se calculó con el promedio de los suero negativos \pm 2 desviaciones estándar (Zumaquero, 2012); el valor obtenido fue 0.529 para anticuerpo y 0.95 para antígeno. Los organismos que dieron positivo a anticuerpo y antígeno pertenecen a la especie *Rattus rattus*.

Para comparar la prueba de triquinoscopía y la técnica ELISA, se utilizó el índice de Kappa de Cohen, el valor obtenido fue 0, lo cual nos dice que no guardan una relación entre ambas pruebas.

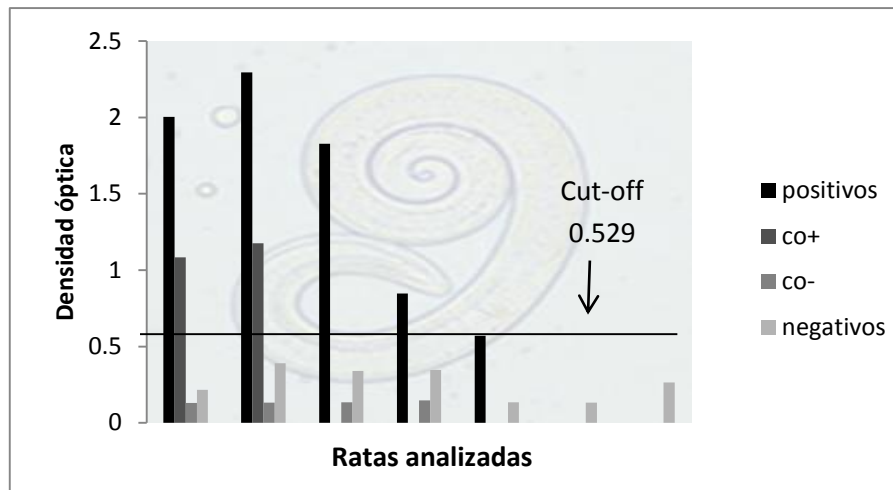


Figura 12: En este gráfico se muestra las densidades ópticas obtenidas en la prueba ELISA para anticuerpo. Se considera positivo todos los valores que estén por encima del valor de corte (Cut-off). El total de ejemplares analizados es 12

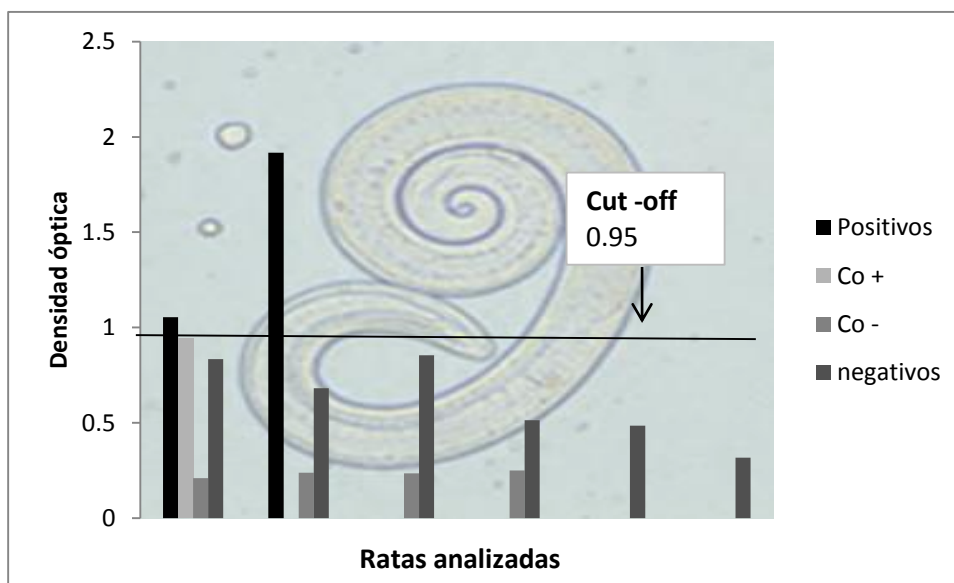


Figura 13: En este gráfico se muestra las densidades ópticas obtenidas en la prueba de ELISA para antígeno. Se considera positivo todos los valores que estén por encima del valor de corte (Cut-off). El total de ejemplares analizados fue de 8

Discusión

En el presente estudio se detectó por primera vez para el Estado de Puebla la presencia de antígenos, y anticuerpos de *T. spiralis* en roedores sinantrópicos en los mercados: Emiliano Zapata y Domingo Arenas, Sn. Martín Texmelucan, lo cual pone en evidencia que el parásito circula en la población de roedores sinantrópicos en el estado; los mercados son espacios que se encuentran plagados convirtiéndolos en una fuente de diseminación del parásito, que favorece la prevalencia de esta zoonosis en el estado.

Consideramos que el esfuerzo de captura es bajo, y suponemos que se vio afectado por diversos factores, como la gran disposición de alimento que tienen en los mercados, pues hay muchos locales que expenden materias primas, cereales, carnes y alimentos varios, los mismos que están a disposición de los roedores que habitan en el lugar. Es altamente probable que las bajas temperaturas propiciaron que los roedores permanecieran en sus nidos (Benavides y Gunet, 2003) y la presencia de depredadores como *Felis silvestris Cattu* (Sherever, 1775). Además pudo verse reflejado en los análisis de triquinoscopía, donde no hubo presencia de quistes en diafragma, en contraste coincidimos con Moreno (2007 y 2009), Jiménez (2005), Ogunniyi y Balogun (2014) y Vives y Zeledón (1957) en que esta es una técnica poco eficiente (entre el 2% y 3% de eficiencia), sin embargo ellos sí observaron quistes de *T. spiralis* mediante esta técnica, esto se debe a que la prueba depende significativamente de la intensidad parasitaria y de la etapa en que se encuentre el parásito, lo cual es imposible determinar en los ejemplares capturados, además de la adecuada obtención de la muestra, cantidad de tejido extraído, análisis oportuno del tejido y una N muy elevada, son factores que juegan un papel importante en esta técnica. Adicional a lo ya mencionado, el uso de cloroformo como anestésico puede destruir los quistes en el diafragma (comunicación personal con Dr. De la Rosa), sin embargo se sigue realizando esta técnica, debido a que esta norma por el reglamento de rastros de México (Reglamento de rastros, Art 5 sec. XV). Proponemos normar la técnica ELISA como control de la calidad de carnes, ya que mediante esta técnica se obtuvo

que 5 ejemplares son positivos para anticuerpo contra *Trichinella spiralis* y 2 contra antígeno.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Vázquez et. al. (2012), y Molina et. al. (2012), en que las pruebas inmunológicas, poseen alta eficiencia y un alto grado de sensibilidad, aún ante una infección baja; además se demuestra que aunque las pruebas de diagnóstico directo sean negativas, no indica la ausencia del parásito (Peña, 2001).

La helmintofauna intestinal encontrada, está representada por 4 especies de los cuales consideramos de especial importancia *Syphacia murrís* debido a que muestra una infección elevada. Nuestro hallazgo coincide con Púlido Flores (2005), quien también encontró este organismo, pero no coincidimos con lo obtenido por: Lannacone y Albariño (2002), Vives y Zeledón (1957), Lanndaeta et. al. (2007), quienes en lugar de esta especie, encontraron a *Syphacia obelata*. Es importante mencionar que *Syphacia murrís* no es una especie que infecte al humano (Kellogg et. al. 1982; Ross et. al. 1980; Wescott, 1982), sin embargo, su importancia radica en que crea inmunodepresión y promueve la infección de otros nemátodos en la rata (Chesney, 2006).

El segundo helminto más abundante es *Trichuris muris*, que es considerado muy común en roedores, al igual que en nuestra investigación, Pulido Flores (2005), Ogunniyi y Balogon (2014), Vives y Zeledón (1957), Feliu (1985), Roman (1951), Bernard (1963), también encontraron presencia de este parásito en roedores silvestres y sinantrópicos, aunque se señala que en México es poco común (Vives y Zeledón, 1957).

El hallazgo de *Capillaria sp* coincide con el trabajo de Pulido Flores (2005), y lo consideramos de importancia ya que es una zoonosis que se transfiere al hombre con facilidad y la rata es su especie reservorio (Duque, 2012; Conolugue, 1979).

Se encontró un huevo de la especie , *Strongyloides sp*; aunque hay pocos reportes en México para este parásito, nuestro resultado coincide con los obtenidos por Vives y Zeledon (1957), que entre la helmintofauna encontrada

reportaron huevos de *Strongyloides sp* en roedores sinantrópicos, aunque desconocemos la especie exacta que se hayo en el ejemplar capturado, se sabe que solo 2 especies de este género parasitan a la rata, *S. venezulensis* (Brump 1934) y *S. ratti* ambas especies toman importancia al comportarse de manera muy similar a *Strongyloides stecoralis*, (Bavay 1876), que afecta al hombre, y se considera potencialmente peligrosa (Goncalves, 2013; Shintoku, 2005).

Strongyloides sp causa problemas en la respuesta inmune de las células t y esto puede propiciar la infección de la rata por agentes patógenos que pueden transmitirse al hombre (Blankenhouse, 2015).

La helmintofauna detectada demuestra que las ratas permiten la preservación y propagación de diferentes parásitos, si tomamos en cuenta que la salubridad de estos lugares se ve comprometida y esto a su vez permite un aumento en la frecuencia con que el hombre interacciona con los roedores, lo cual favorece que los parásitos que entre ellos son comunes, por accidente contaminen fuentes de agua y comida de los humanos, mientras están en búsqueda de refugio o comida, tal y como señala Ogunniyi y Balogon (2014).

También es importante señalar que las interacciones de las ratas con sus predadores como los gatos, los cuales son muy abundantes en el mercado, permiten la diseminación del parasito, considerando esto es de importancia para la salud pública (Ceruti. et. al, 2000).

La presencia de poblaciones densas de roedores y las deficientes condiciones de saneamiento ambiental, son factores que predisponen a la infección humana con algunos helmintos, además la alta prevalencia de parásitos en roedores sinantrópicos son factores que incrementan el riesgo de transmisión a otros mamíferos que cohabitan en áreas específicas (Duque, 2012). Por lo mismo se propone realizar un estudio más amplio de la helmintofauna parasitaria y de *Trichinella spiralis*, en el estado de Puebla, con el fin de conocer la abundancia de estas y su distribución. También se propone retomar las campañas de

desratización y tomar medidas para incrementar la higiene en los mercados, pues aunque se han llevado a cabo varias campañas de desratización, se sigue observando presencia de roedores, tal como lugares con heces abundantes, sitios roídos, y muchos lugares abandonados y en mal estado, que pueden ocupar como refugio. Es vital evitar la propagación de los diversos parásitos y mejorar las condiciones de higiene, con el fin disminuir espacios que los roedores puedan invadir y a su vez contaminar los productos alimentarios que se expenden en los mercados.

Conclusiones

Se observó presencia de antígenos y anticuerpos de *Trichinella spiralis* en los sueros de *Rattus rattus* capturados en el estado de Puebla. Es el primer reporte de la presencia indirecta de este parásito para el estado. Pero existen evidencias indirectas de la presencia de *Trichinella spiralis* en roedores sinantrópicos en el estado de Puebla.

En cuanto a la helmintofauna intestinal, se identificaron cuatro especies de helmintos en *Rattus rattus*, siendo esta la única especie capturada que presentó helmintofauna intestinal.

Podemos concluir que existe una prevalencia alta de parásitos intestinales en los roedores capturados y que *Trichinella spiralis* circula en la población de ratas en el estado de Puebla.

Referencias

- **Barragán, J.** (1893) *“Breves consideraciones sobre la triquina en México,”* Tesis de la Facultad Nacional de Medicina, México, D. F., Terrazas.
- **Barriga Omar O.** (2003) *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Tercera edición III Publicación Científica y Técnica No. 580 Washington DC sección B 3 ; p.p 325
- **Benavides F. J. y Guénet. Jean-L.** (2003) *Manual de genética de roedores de laboratorio principios básicos y aplicaciones,* Universidad de Alcalá de Henares. Texas.; 2 p.p 59
- **Bernard J.** (1963) *Estudios sobre la fauna parasitaria de Tunisie, nematodos parásitos de Muridos.* Inst. Pasteur Tunnisse, 1963; 55 (2) p.p 451-456
- **Berenguer gallego J.** (2006) *Manual de parasitología. Universidad de Barcelona. España*
- **Berumen de la Torre V. Escobedo Muñoz, Moreno García M. A.** (2002) *Trichinellosis en perros callejeros en Zacatecas México,* Parasitol. Latinoam. ; 57, (72) p.p 74
- **Blankenhaus B., Klemm U., Eschbach M.-L., Sparwasser T., Huehn J., Kühl Anja A., Loddenkemper C., Jacobs T. and Breloer M.** (2011) *Strongyloides ratti Infection Induces Expansion of Foxp3 Regulatory T Cells That Interfere with Immune Response and Parasite Clearance in BALB/c Mice.* J Immunol ; 186 p.p 4295-4305
- **Cabral-Soto J., Villicana H., Fragoso-Uribe R. y Contreras A.** (1990) *Perfil epidemiológico del estado de Zacatecas* Salud Publica Mex ; 32 p.p 575-582.7
- **Camet Jean D.** (2000) *Trichinellosis: a worldwide zoonosis.* Veterinary Parasitology ; 93 p.p 191–200
- **Ceruti R. Sonzogni O. Origgi F. Vezzoli F. Cammarata S. Giusti a. M Y Scanzian E.** (2001) *Capillaria hepatica Infection in Wild Brown Rats (Rattus norvegicus) from the Urban Area of Milan, Italy* J. Vet. Med. B; 48, p.p235 - 240.
- **Chávez Guajardo E. G., Saldivar Elías S., Muñoz Escobedo J. J., Moreno García M. A..** (2006) *Trichinellosis una zoonosis vigente.* REDVET ; 7 (5)
- **Chesney M., Prem G.,† Nieuwenhuizen N., y Brombacher F.** (2006) *Infection with Syphacia obelata (Pinworm) Induces Protective Th2 Immune Responses and Influences*

Ovalbumin-Induced Allergic Reaction. INFECTION AND IMMUNITY; 74, (10) p.p 5926–5932

- **Ciriaco A., Mendiola J., Falcon D. y Cantillo J.** (1998) *Obtención de sangre e inyección intravenosa en roedores por la vía de la vena safena*, Rev. Cubana de medicina tropical ; 50, (2)
- **Conolugue G. Foreyt W. Michael A. + y Harvey L. +.** (1979) *Capillari Hepática (Bancroft) in select rat populations of Hartford, Connecticut, with possible public health implications*. J. Parasitology ; 65, (1) p.p 105-108
- **Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC)** s.f. *Técnicas de obtención e inoculación de muestras universidad autónoma de Madrid 2.A*
- **Del Río A., Herrera D R.M.** (1984) *Primer hallazgo de Trichinella spiralis en el diafragma de un cadáver en Zacatecas*. Salud Pública De México; 26, (6) 596-598.
- **Duque B. A. Aranzazu D. Agudelo F. P. Londoño A. F. Quiroz V. H Roda J. D.** (2012) *Rattus norvegicus como indicador de la circulación de Capillaria hepática y Taenia taeniaeformis en la Plaza Minorista de Medellín, Colombia*. Biomédica ; 35 p.p 510-518
- **Ernest D. Olfert DVM; Brenda M. Cross DVM; y McWilliam A** (1993) *Guide to the care and use of experimental animals* Canadian Council on Animal Care
- **Fabregas X, Benito J.** (2001) *Trichinella: epidemiología y nuevas perspectivas de inspección sanitaria en carne de equino*, Eurorcarne; 94.
- **Feliu, C., Torres, J., Gállego, J., Gosilbez, J. & Ventura.** (1985) *Primeros datos acerca de la helmintofauna de los roedores del Delta del Ebro (Península Ibérica)*. Misc. Zool; 9 p.p 55-64.
- **Flisser P. A. y Tamayo R. P.** (2006) *Aprendizaje de la parasitología basado en problemas*. ETM México 50
- **Gonçalves Ribeiro A. L. Vieira Silva C. Goulart Carvalho E. F. Tiduko Ueta M. y Costa-Cruz J. M.** (2013) *Transmisión transmamaria de estrongiloidiasis en ratas inmunosuprimidas* Neotrop. Helminthol; 7, (2).
- **Gracey, J.F. Collins, and D.S. and Huey, R.J.**(1999) *Meat Hygiene*. W.B. Saunders, London; 10th edition.

- **Herrera R. , Del Rio (1987) *Trichinella spiralis : Inmunochemical Characterización of Antigens in Experimental Infections.* Exp Parasitol ; 63 p.p 233-236**
- **Kellogg, H. S., and Wagner J. E. (1982) *Experimental transmission of Syphacia obvelata among mice, rats, hamsters, and gerbils.* Lab. Anim. Sci. ; 32 500-501**
- **Lamberti R. O. Gino L. M. Pombar A. Calvo C. (2000) *Técnicas de diagnóstico de trichinellosis* Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias.- Universidad Nacional de La Pampa.**
- **Lannacone O. J. Albariño F. L. (2002) *Helmintofauna de Rattus rattus (Linnaeus, 1758) y Rattus norvegicus (Berkenhout, 1769) (Rodentia: Muridae) en el distrito de San Juan de Lurigancho, Lima Perú.* Rev Peru Med Exp Salud Publica ; 19, (3)**
- **Martínez Vázquez J. González Monrroy R. M. (2006) *Manual de métodos de recolecta de plantas y animales.* Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de biología Dirección general de fomento editorial México. p.p 234**
- **Mazzoti L. (1953) *Triquinosis en México, Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, México , D. P.***
- **Mc. Garry J.W, Higgns A , White N. G, White K. C , Pounder K. C. y Hetzel U.(2014) *Zoonotic Helminths of Urban Brown Rats (Rattus Norvergicus) in the U.K: Neglected public Health Considerations* Zoonoses and Public Health; 10 p.p 111**
- **Molina V, Albarracín, S, Krivokapich, S, Chiosso, C, Mancini, S., Bigatti, R, Arbusti, P, Avila, A , Larrieu, E. (2012) *Seroepidemiología y control de trichinellosis en cerdos en Sierra Grande, Argentina.* InVet.; 14 1. p.p 33-40**
- **Moreno García M. A. Muñoz Escobedo J. J. Reveles Hernández R. G. Saldívar Elías S. y De La Torre Vacío M. Del R. . (2012) *Utilización de técnicas directas e indirectas en el diagnóstico de trichinellosis en cerdo.* Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad de Biología celular y microbiología**
- **Moreno García M. A. Maldonado Tapia C. H., García Mayorga E. A. Reveles Hernández R. G. Muñoz Escobedo J. J., (2009) *Fase intestinal de Trichinella spiralis en modelo murino* Acta.Biol. Colomb.; 14. (1) p.p 203 -210**
- **Moreno García M. A. Tapia Maldonado C H Ruvalcaba Chávez M. I. Hernández R. Reveles Gutiérrez J. Rivas Escobedo Muñoz JJ (2009) *Epidemiología, diagnóstico y***

tratamiento de la Trichinellosis, una zoonosis desatendida. Universidad Autónoma de Zacatecas, México XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Asunción Paraguay; p.p 22-24 . Mesa Redonda de Zoonosis.

- **Murrell K. . y Pozio E.** (2012) *Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis, 1986–2009.* Emerging Infectious Diseases ; 17, (12).
- **Ogunniyi T. y 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) pp.134-140
- **Ortega-Pierres M.G., Arriaga C, Mulia Y.** (2000) *Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America.* Veterinary Parasitology ; 93 p.p 201–225
- **Owen R.** (1835) *Description of a microscopic antigen infesting the muscle of human body.* Trans Zool Sci ; 1 p.p 315-324.
- **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 DS.** (2009) *Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the Trichinella genus.* Infection, Genetics and Evolution; 9, (4) p.p 606-616.
- **Pozio E. y Murrell K. D.** (2011) *Worldwide Occurrence and Impact of Human Trichinellosis.* Emerging Infectious Diseases ; 17, (12)
- **Reglamento de rastros.** (1989) Artículo 5 sección xv. publicado en el suplemento al periódico oficial número 4912
- **Ribicich M. Gamble H. R., Bolpe J. Scialfa E. & Krivokapich S. Cardillo N. Cambiaggi Holzmann M. L. Pasqualetti M. Fariña F. y Rosa A.** (2010) *Trichinella infection in wild animals from endemic regions of Argentina.* Parasitol Res ; 107 p.p 377–380
- **Romero Almaraz Ma. De L. Sanchez Hernández C. Garcia Estrada C. Owen R. D.** (2000). *Mamíferos pequeños, manual de técnicas de captura, preparación y estudio.* Primera edición. Centro de investigaciones biológicas UAEM, UNAM, México: capítulo 3
- **Román, E.** (1951) *Estudio ecológico y morfológico de de Acantocefalos y Nematodos parasitos de ratas, en la región Lyonnaise.* Mem. Mus. Nat. His. Nat. Zoo. ; 2 , (2) p.p 49-270

- **Ross, C. R., J. E. Wagner, S. R. Wightmen, and S. E. Dill.** (1980) *Experimental transmission of Syphacia muris among rats, mice, hamsters and gerbils.* Lab. Anim. Sci.; 30 p.p 35-37.
- **Sandoval Franco LO, García Mde Caballero, Hernández GR, Moreno García MA, Jiménez Cardoso E.**(2012) *Molecular similarities and differences between Trichinella spp., isolated from canine skeletal muscle in Zacatecas, Mexico.* Exp Parasitol ; 131 (2) p.p148-52
- **Schad, G.A., Duffy, C.H., Leiby, D.A., Murrell, K.D., Zirkle, E.W.** (1987) *Trichinella spiralis in an agricultural ecosystem: transmission under natural and experimentally modified on-farm conditions.* J. Parasitol ; 73 p.p 95–102
- **Servicio Meteorológico Nacional.** Consultado en Abril de 2014 Disponibilidad en línea http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=178:puebla&catid=14&Itemid=2
- **Shintoku Y, Kimura E, Kadosaka T, Hasegawa H, Kondo S, Itoh M, Islam MZ.**(2005) *Strongyloides ratti infection in the large intestine of wild rats, Rattus norvegicus.* J Parasitol; 91, (5):1116-21.
- **Takumi Katsuhisa, Franssen Frits, Fonville Manoj, Grasset Aurelie, Vallee Isabelle, Boireau, Teunis Pascal Peter y Van der Giessen Joke.**(2001) *Within-host dynamics of Trichinella spiralis predict persistent parasite transmission in rat populations.* int. j. parasitol; .40 p.p 1317-1324
- **Thienpont D. Rochette F. y Vanparjis O.** (1986) *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico.* 17 p.p31-33
- **Vazquez Tsuji O. y Campos Rivera T.** (2012) *Epidemiología de la triquinelosis México.* Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría ; 26, (101)
- **Valenzuela Ramírez M.** (1981) *Epidemiología de la triquinelosis.* Clínica Veterinaria 3 Departamento de Virología e inmunología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria, México, D. F.
- **Vives N. y Zeledón R.** (1957) *Observaciones parasitológicas en ratas de San José, Costa Rica,* Rev. Biol. Trop.; 5, (2) p.p 173-194,
- **Voller A.** (1978). *The enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.)* W.H.O: 2 (1)
- **Wescott, R. B.** (1982) *Helminths, in: The Mouse.* Biomedical Research Vol.II: Diseases. FosterH. L., J. D. Small, and J. E. Fox ; p 373-384. Academic press, New York

- **Zumaquero Ríos J. L. García-J. J. de-la-Rosa-Aran J. L. Marcet R. Sarracent-Pérez Jorge,** (2012) *Trichinella spiralis: Monoclonal antibody against the muscular larvae for the detection of circulating and fecal antigens in experimentally infected rats.* Experimental Parasitology : 132 p.p 444–449
- **Zavala J T. Sánchez Vega J. Ruiz Sánchez D Calderón Romero L. García Yañez Y, Alonso T, Martínez Chacón J F, Rivas C.** (2004) *Estado actual de nuestros conocimientos sobre trichinellosis en la república mexicana, reporte de nuevas localidades infectadas .* G Rev Fac Med UNAM; 47. (3)

ANEXOS

Anexo 1: localización de los puntos de colecta de los Mercados concentradores de roedores

| | Latitud Norte | | | Longitud Oeste | | | Altura |
|---------------------|---------------|-----|------|----------------|-----|------|--------|
| | grados | min | Seg | grados | min | seg | |
| Zapata 1 | 19 | 0 | 18.8 | 98 | 13 | 2.1 | 2100 |
| Zapata 2 | 19 | 0 | 18.6 | 98 | 13 | 2.4 | 2130 |
| Zapata 3 | 19 | 0 | 17.8 | 98 | 13 | 2.4 | 2130 |
| Zapata 4 | 19 | 0 | 17 | 98 | 12 | 7.4 | 2146 |
| Zapata 5 | 19 | 0 | 33.6 | 98 | 13 | 6.2 | 1944 |
| Zapata 6 | 19 | 0 | 26.2 | 98 | 13 | 5.4 | 1962 |
| Zapata 7 | 19 | 0 | 19.5 | 98 | 13 | 1.2 | 2121 |
| Zapata 8 | 19 | 0 | 19 | 98 | 13 | 1.6 | 2118 |
| Zapata 9 | 19 | 0 | 18.8 | 98 | 13 | 3 | 2104 |
| Zapata 10 | 19 | 0 | 19.2 | 98 | 13 | 1.5 | 2119 |
| Zapata 11 | 19 | 0 | 19.6 | 98 | 13 | 1.6 | 2118 |
| Zapata 12 | 19 | 0 | 19.7 | 98 | 13 | 1.6 | 2118 |
| San Martin 1 | 19 | 16 | 59.2 | 98 | 25 | 24.2 | 2240 |
| San Martin 2 | 19 | 16 | 60.3 | 98 | 25 | 27.3 | 2246 |
| San Martin 3 | 19 | 16 | 58.7 | 98 | 25 | 25.8 | 2242 |
| San Martin 4 | 19 | 16 | 59.8 | 98 | 25 | 26.2 | 2244 |

Anexo 2: Cebos utilizados

- Avena, miel, Extracto de vainilla y maíz molido
- Sardinias
- Salchicha cruda
- Chorizo
- Salchicha cocida con orégano
- Avena cruda
- Cereales comerciales
- Pan de dulce

Anexo 3: Técnica de ELISA

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 µl 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 suero para anticuerpo:
Disolver 10 μ l de suero sanguíneo en 490 μ l de PBS Tween (Diluir solo cuando este por emplearse)
- Disolución de suero para antígeno:
Disolver 25 μ l de suero sanguíneo en 75 μ l de PBS Tween (Diluir solo cuando este por emplearse)
- 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.

Prueba para detección de antígeno:

- Recubrimiento:
 1. Diluir 10 µg de anticuerpo policlonal por 1 ml de buffer de Recubrimiento.
 2. Agregar 100 µl en cada pocillo.
 3. Cubrir con papel aluminio y incubar en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 4. Decantar
- Bloqueo:
 1. Colocar 300 µl por pocillo de solución de bloqueo
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.
- Disolución de las muestras:
 1. Agregar 100 µl por pocillo de la Disolución del suero para antígeno
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.
- Anticuerpo monoclonal:
 1. Agregar 100 µl por pocillo de disolución de antígeno monoclonal
 2. Incubar por 1hr a 37°C.
 3. Decantar y lavar por PBS Tween 4 veces.
- Conjugado:
 1. Colocar 100 µl de Disolución de conjugado anti ratón por pocillo
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 6 veces.

- Sustrato:
 1. Se añade 100 µl de Solución Sustrato por poso
 2. Se cubre con papel aluminio y se deja reposar por 15 min.
- Se detiene la reacción agregando 50 µl de solución Stop por pocillo.

Detección de anticuerpo:

- Recubrimiento:
 1. Agregar 1 µg de antígeno (Ag) de excreción-secreción por 1 ml de buffer de Recubrimiento.
 2. Agregar 100 µl en cada pocillo.
 3. Cubrir con papel aluminio he incubar en cámara húmeda por 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C
 4. Decantar
- Bloqueo:
 1. Colocar 300 µl por pocillo de solución de bloqueo
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C o toda la noche a 4°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.
- Disolución de las muestras:
 1. Agregar 100 µl por pocillo de la Disolución del suero para anticuerpo.
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 4 veces.
- Conjugado:
 1. Colocar 100 µl de Disolución de Proteína G por pocillo
 2. Incubar en cámara húmeda 1hr a 37°C.
 3. Decantar y lavar con PBS Tween 6 veces.
- Sustrato:
 1. Se añado 100 µl de Solución Sustrato por pocillo
 2. Se cubre con papel aluminio y se deja reposar por 15 min.
- Se detiene la reacción agregando 50 µl de solución Stop por pocillo.

Anexo 4: Técnica de Flotación de Willis

Soluciones

- Solución de Willis: Se prepara una disolución saturada de NaCl, con densidad de 1.2
- Lugol al 2%

Procedimiento

- Tomar aproximadamente 2gr de heces frescas, con un abatelenguas
- Colocar la muestra en un vaso precipitado , con 10ml de solución de Willis y agitar
- En un tubo de ensayo, filtrar la mezcla con ayuda de una gasa, llenando hasta el borde del tubo
- Colocar un portaobjetos sobre el tubo de manera que el líquido toque el portaobjetos
- Dejar reposar por 15 minutos
- Retirar el portaobjetos y teñir con una gota de lugol al 2%
- Colocar el cubreobjetos y observar al microscopio con lente 40X