

Detección de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en muestras de caballos por medio de pruebas inmunodiagnósticas

¹Miriam Susana Medina Lerena, ¹Efraín Pérez Torres, ²Jorge Luis de la Rosa Arana, ¹Miguel Ángel Pérez Ramírez, ¹Yahaira Saraí Nuñez Avalos, ¹María de Jesús Guerrero Rubio

Detection of antibodies against *Trichinella spiralis* in horse samples by means of immunodiagnostic tests

¹Laboratorio de Medición Paracĺınica del Departamento de Salud Pública de la Divisi3n de Ciencias Veterinarias, Centro Universitario de Ciencias Biol3gicas y Agropecuarias de Universidad de Guadalajara. Km. 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Camino Ing. Ram3n Padilla S3nchez No.2100, Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco, M3xico. Tel. +52(33)37771150 ext. 33194.

Autor para correspondencia: miriam.mlerena@academicos.udg.mx

Resumen

La triquinosis es considerada una zoonosis transmisible al hombre por consumo de carne de cerdo cruda o poco cocida con larvas viables de *Trichinella spiralis*, el caballo est3 relacionado con la transmisi3n al humano. La exportaci3n de Canad3, M3xico y Yugoslavia de caballos puso en evidencia la importancia del consumo de carne de caballo infectado, al originarse brotes en Francia. El diagn3stico clĩnico por ausencia de manifestaciones puede ser subclĩnica y pasar inadvertida. Los m3todos directos como la triquinoscopĩa y digesti3n artificial; se emplean para detectar larvas, mientras que los m3todos inmunoenzim3ticos detectan anticuerpos contra antĩgenos de larvas musculares. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos

específicos contra *Trichinella spiralis* por pruebas inmunodiagn3sticas (ELISA y Western Blot) en caballos en pie. Metodologĩa: Se obtuvieron 200 muestras de suero de caballos, el antĩgeno utilizado ensayos inmunoenzim3ticos, consistieron en los productos obtenidos de excreci3n y secreci3n (E/S) de las larvas musculares (LM) de *T. spiralis*, utilizando la determinaci3n de anticuerpos por ELISA y confirmando con WB. Resultados y discusi3n: Los 200 sueros de caballos resultaron negativos a las pruebas de ELISA y Western Blot. 142 fueron machos y 58 hembras, Reflejando un estatus zoonosanitario bueno que no representa riesgo en caso se manden los caballos al rastro para consumo. Por otro lado, las t3cnicas inmunodiagn3sticas para la detecci3n de anticuerpos tienen una alta sensibilidad y especificidad. Conclusiones: Los caballos analizados para detecci3n de anticuerpos contra *T. spiralis* en este estudio no representa un peligro en salud pública por lo que estos animales est3n libres de triquina. Es importante que se inspeccione la carne de equino para evitar riesgos al consumidor.

Palabras clave: *Trichinella*, pruebas inmunodiagn3sticas, caballos.

Abstract

Trichinosis is considered a zoonosis transmissible to man by

consumption of raw or undercooked pork with viable larvae of *Trichinella spiralis*, the horse is related to human transmission. The export of horses, Mexico and Yugoslavia showed the importance of the consumption of infected horse meat, when outbreaks originated in France. The clinical diagnosis by absence of manifestations, can be subclinical and go unnoticed. Direct methods such as trichinoscopy and artificial digestion; they are used to detect larvae, while immunoenzymatic methods detect antibodies against muscle larval antigens. The objective of this study was to determine the presence of specific antibodies against *Trichinella spiralis* by immunodiagnostic tests (ELISA and Western Blot) in standing horses. Methodology: 200 horse serum samples were obtained, the antigen used immunoenzymatic tests, consisted of the products obtained from excretion and secretion (E/S) of the muscle larvae (LM) of *T. spiralis*, using the determination of antibodies by ELISA and confirming with WB. Results and discussion: The 200 horse sera were negative for ELISA and Western Blot tests. 142 were males and 58 females, reflecting a good animal health status that does not represent a risk if the horses are sent to the trail for consumption. On the other hand, immunodiagnostic techniques for the detection of antibodies have a high sensitivity and specificity. Conclusions: The horses analyzed for detection of antibodies against *T. spiralis* in this study do not

represent a public health hazard, so these animals are free of trichina. It is important that equine meat be inspected to avoid risks to the consumer.

Key Words: *Trichinella*, immunodiagnostic tests, horse.

Introducción

La triquinelosis es una zoonosis parasitaria de distribución mundial, ocasionada por el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida que alberga larvas viables del nematodo *Trichinella spiralis* (Arriaga et al. 1995; Zumaquero-Rios et al. 2012). Los ganados porcino y equino han sido identificados como una de las principales fuentes de transmisión para el ser humano (Gamble et al. 1996). La mayoría de los casos humanos son ocasionados por la especie *T. spiralis*, aunque no deben excluirse el riesgo potencial de adquirir la enfermedad por otras especies como *T. pseudospiralis*, *T. nelsoni*, *T. britovi* y *T. nativa*. En México solo se ha descrito la circulación de *T. spiralis* en los animales domésticos y peridomésticos. En los últimos años, se ha aumentado la crianza equina y se ha mejorado la calidad genética de estos animales. El Estado de Jalisco depende económicamente de la crianza del caballo ya que se incrementaron los espectáculos de caballos en sus diversas modalidades, como lo son la charrería, el rodeo, los coleaderos, así como el hipismo y otras actividades donde el caballo es el protagonista principal. Se encuentran varias razas la cuales cuentan con gran competitividad internacional en las cuadras jaliscienses, como en cuarto de milla, frisonas, españoles y pintos, por citar algunas. Por otro lado, los ranchos de caballos implican

una cadena productiva que involucra empresas de alimentos, médicos veterinarios, caballerangos, jinetes y los sitios de espectáculos que cada vez más se consolidan y al igual que crece la economía del país.

La importancia del diagnóstico para detectar la presencia de *Trichinella* en carne de caballo se documentó durante los brotes de triquinelosis en Francia que ocurrieron en 1993, 1994 y 1998 (Pozio et al. 1997; Ancelle et al. 1998). A nivel mundial, México junto con Canadá y Yugoslavia son los principales países productores y exportadores de carne de caballo. Aunque en México la carne de caballo como fuente de alimentación para el ser humano no es común, la búsqueda del nematodo se lleva a cabo en los rastros de Tipo Inspección Federal (TIF), los cuales funcionan bajo principios sanitarios internacionales ya que la carne será exportada a Europa y Asia. El marco legal que regula la obtención de la carne en México se establece en la NOM 194-SSA1-2004 (Productos y Servicios. Especificaciones Sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales de abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos), donde en el capítulo de inspección y muestreo del parásito en rastro donde se establece que la carne de cerdo y equino deben de estar libres de *Trichinella spiralis*.

Los procedimientos diagnósticos empleados en los rastros TIF buscan poner de manifiesto la presencia de la larva muscular en muestras de músculo mediante las técnicas de triquinoscopía y de digestión artificial. Sin em-

bargo, estas técnicas tienen la desventaja de que su sensibilidad analítica es de una larva en 10 g de carne. Los rastros que no son establecimientos TIF, tienen la limitante de no disponer de infraestructura analítica para el diagnóstico del parásito (Jiménez et al. 2005). Por otro lado, el diagnóstico clínico de la triquinosis en los animales es muy difícil debido a que las manifestaciones clínicas son directamente proporcionales a la carga parasitaria. En la mayoría de los casos la infección pasa inadvertida.

Una alternativa al diagnóstico directo es la determinación de anticuerpos en muestras de suero. Aunque los anticuerpos no son un indicativo de la parasitosis activa, proporcionan información sobre el contacto entre el hospedador y el parásito, la cual es importante para establecer áreas con presión parasitaria. Los inmunoensayos, como el ELISA y el Western blot son las técnicas de más amplio uso (Gamble et al. 2004), las cuales tienen sensibilidad y especificidad diagnósticas cercanas al 100%. La limitante de la detección de anticuerpos es que éstos se detectan a partir de la segunda-tercera semana de infección (Tinoco-Velázquez et al. 2002; Zumaquero-Ríos et al. 2012). Los métodos basados en la reacción en cadena polimerasa se consideran inapropiados al momento de la inspección de carne en los rastros, debido a la dificultad de realización y el alto costo, pero son útiles para la identificación del genotipo de las larvas aisladas de tejidos animales y humanos en la investigación epidemiológica.

Datos del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica indican que los Estados de

la República con mayor número de casos humanos reportados entre 1990 y 2016 son Hidalgo, Chihuahua, Veracruz, Jalisco, Oaxaca, Ciudad de México, Estado de México, Nayarit y Zacatecas. En Jalisco se han reportado 79 casos en este periodo, pero en 2016 se reportaron 3 de los 7 casos que se reportaron para México en 2016. Varios estudios epidemiológicos realizados en México han encontrado la presencia de *Trichinella* en caballos del Estado de México, pero se desconoce la prevalencia y distribución de este parásito en caballos faenados en el estado de Jalisco.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* por medio de pruebas inmunodiagnósticas (ELISA y Western Blot) en caballos en pie.

Material y Métodos

El muestreo de caballos se realizó en las localidades de El Arenal, Tala, El Refugio, Huaxtla, Santa Cruz del Astillero, San Isidro Mazatepec y Magdalena de la Región Valles en el Estado de Jalisco. Se colectaron 200 muestras de sangre de la vena yugular. El tamaño de muestra se manejó como “muestreo de oportunidad”. Se obtuvieron de 3 a 5 mL de sangre para ser llevados al laboratorio. Posteriormente las muestras se transportaron en refrigeración a 4°C al Laboratorio de Medición Paraclínica. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, esto para separar el paquete plaque-

tario y obtener el suero. Una vez separado este se envaso en tubos con 1.5 mL de suero y se congelaron hasta su uso. Para la determinación de anticuerpos se utilizaron los productos de excreción y secreción de la larva muscular de *T. spiralis* como fuente de antígeno. Los pozos de placas para ELISA de alta unión se sensibilizaron durante 18 horas a 4°C con 0.050 mL/pozo con los productos de excreción y secreción de la larva muscular diluidos a 5 µg/mL en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. El antígeno se descartó y los pozos se lavaron tres veces con 0.300 mL de PBS adicionado con Tween 20 al 0.05 %. Después se bloquearon durante 1 hora a 37 °C con 0.250 mL de albúmina sérica bovina al 1% en PBS-T. Los sueros se diluyeron 1:250 en PBS-T y se colocaron directo en el pozo, incubando a 37 °C por 60 minutos. La reacción antígeno-anticuerpo se reveló con proteína A peroxidasa, diluida 1:1,000 en PBS-T, colocando 0.050 mL por pozo, e incubando a 37 °C por 60 minutos. La reacción se puso en evidencia con 0.050 mL/pozo de una solución de cromógeno preparada con 10 mL de una solución de citrato de sodio (5 mL) 0.1M y ácido cítrico (5 mL) 0.1 M, 0.004 g de orto fenilendiamina (Sigma Aldrich) y 0.004 ml de H₂O₂ al 30 % y la reacción se detuvo agregando a cada pozo 0.050 ml de H₂SO₄ 1N. La placa se leyó a 492 nm en un lector para ELISA. Valores de absorbancia mayores o iguales a 0.2 se consideran positivas (Tinoco-Velázquez et al. 2002; Zumaquero-Ríos et al. 2012). El western blot se llevó a cabo en geles preparativos de poliacrilamida al 12%, donde se separaron las proteínas

de los productos de excreción y secreción a una corriente de 120 volts. Finalizado el procedimiento se colocó cada gel en un cartucho para transferencia y la transferencia se llevó a cabo a 100 volts por una hora. Luego, la membrana de nitrocelulosa con poro 0.2µm se colocó en un recipiente con una solución de bloqueo de leche descremada al 2.5% en PBS-Tween al 1% la cual estuvo en agitación constante alrededor de una hora a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.05%, luego se cortaron tiras de 3 mm de ancho y se separó el marcador de peso molecular. A continuación, se realizó la reacción inmunoenzimática colocando un volumen de 500 µL de suero problema en una dilución 1:800 en agitación constante por una hora, lavando las tiras tres veces por 5 minutos con PBS-Tween al 0.05%. Se colocó el anti-anticuerpo de Proteína A en un volumen de 500 µL para cada tira en una dilución 1:2000 y se incubó dos horas en agitación constante, al final se realizaron tres lavados solo con PBS por 5 minutos en agitación. Al final se agregó una solución de diaminobencidina (DAB) a 7.5mg/mL y peróxido de hidrógeno al 30% para su posterior paro con agua bidestilada al detectarse la aparición de las bandas en las tiras de nitrocelulosa. El criterio de positividad fue el reconocimiento de las bandas de 45, 49 y 55 kDa.

Resultados

El muestreo se llevó a cabo en la Región Valles en el Estado de Jalisco entre agosto de 2015 y julio de 2017. Un total de 142 muestras fueron obtenidas de caballos machos y 58 hembras. La figura 1 muestra la función zootécnica

de los animales utilizados en este estudio. La mayoría de los caballos muestreados fue para reproducción, seguida por charrería y carga. Sin embargo, hubo casos en que los encargados de los animales contestaron que desconocían la función zootécnica de los animales. El rango de edad de los animales muestreados fue desde seis meses hasta los 26 (figura 2). Se obtuvieron un total de 200 sueros de caballo, los cuales resultaron negativos a las pruebas de ELISA y Western blot.

Discusión

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica de tipo epidémica y de origen alimentario asociada al principalmente al ganado porcino (Estupiñán 2018). Recientemente se ha documentado a nivel mundial que la carne de equinos, además de con la incorporación de otras fuentes de infección, como la carne proveniente de pumas, jabalíes entre otro puede ser una fuente de infección afectando al ser humano cuando consume carne contaminada. (Pasqualetti 2014).

La Asamblea Mundial de la Salud aprobó en el año 2005 la reglamentación que contempla la prevención, así como el control para evitar la propagación de enfermedades infecciosas de interés en salud pública, se reporta que enfermedades infecciosas como por ejemplo provocadas por *Trichinella*, surgen debido a fallas de bioseguridad en la producción primaria, lo cual implica que alimentos contaminados con agentes infecciosos representan un factor de riesgo para la salud pública (López Arias 2018).

Jalisco es un Estado ganadero por excelencia, por lo que la función zootécnica de los animales representa un ingreso económico en función al sector equino. Al mismo tiempo representa un ingreso monetario al vender su carne tanto a nacional como internacional.

Conclusión

Las muestras obtenidas para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* por medio de pruebas inmunodiagnósticas (ELISA y Western Blot) en caballos en pie en las localidades de El Arenal, Tala,

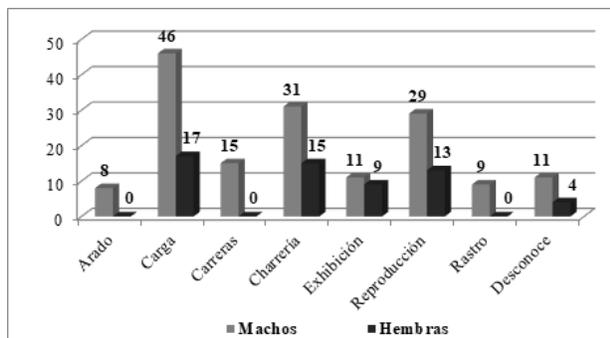


Fig. 1. Función zootécnica de los animales muestreados.

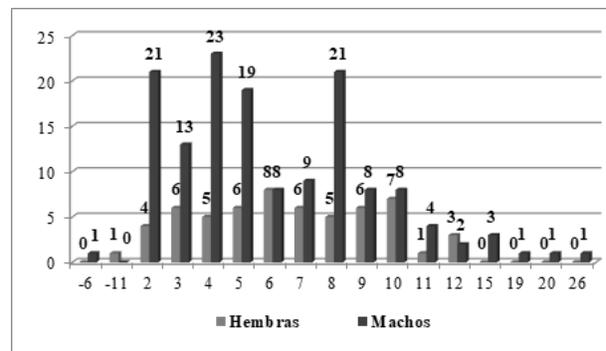


Fig. 2. Edad de los animales muestreados.

El Refugio, Huaxtla, Santa Cruz del Astillero, San Isidro Mazatepec y Magdalena de la Región Valles en el Estado de Jalisco sugiere que estos no han tenido contacto con *Trichinella* y en caso de que se envíen a rastro estos no representan un peligro para el consumidor.

Literatura citada

- Ancelle, T., C. J. Dupouy, J. C. Desenclos, E. Maillot, H. S. Savage, F. Charlet. 1998. A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from North America to France in 1993. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59(4): 615-619.
- Arriaga, C., M. L. Yopez, N. Viveros, L. A. Adame, D. S. Zarlenga, J. R. Lichtenfels. 1995. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *Journal Parasitology*. 81:781-783.
- Estupiñán, S., & Priscila, K. (2018). Determinación de la presencia de *Trichinella spiralis* en porcinos (*sus scrofa domesticus*) por digestión artificial en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Gamble, H. R., A. A. Gajadhar & M. B. Salomon. 1996. Methods for the Detection of Trichinellosis in Horses *Journal of Food Protection*, 59(4): 420-425.
- Gamble, H. R., E. Pozio, F. Bruschi, K. Nöckler, C. M. Kapel, A.A. Gajadhar. 2004. International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. 11(1): 3-13.
- Jiménez C. E., G. L. M. Caballero, G. G. Uribe, H. E. Trejo, J. R. Gay. 2005. Frequency of *Trichinella spiralis* in blood and muscles of horses from two slaughter houses (industrial and rural) in the State of Mexico, Mexico, *Veterinaria México*, 30(3): 269-278.
- López Arias, A. 2018. Evaluación de la presencia de *Trichinella* spp. y determinación de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Leptospira* spp., en roedores capturados en granjas de producción porcina en Colombia. Tesis Maestría en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad de Antioquia. 119 p.
- Pasqualetti, Mariana Inés; Marcelo Acerbo, Marcelo Abas, Adriana Beatriz Rosa, Fernando Adrián Fariña, Natalia Marina Cardillo, Osvaldo Degregorio, Miriam Mabel Ribicich. 2014. Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Revista de Medicina Veterinaria (B Aires)*, 95 (2):12 – 21.
- Pozio, E., A. Tamburrini, L. Sacchi, M. M. A. Gómez, S. Corona, E. Goffredo & G. La Rosa. 1997. Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. *International Journal for Parasitology* 27:1613-1621.
- Tinoco-Velázquez, I., A. Gómez-Priego, R. Mendoza, J. L. de-la-Rosa. 2002. Searching for antibodies against *Trichinella spiralis* in serum samples of patients with febrile syndrome. *Annals Of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(4):391-395.
- Zumaquero-Ríos, J.L., J. García-Juárez, J.L. de-la-Rosa-Arana, R. Marcet, J. Sarracent-Pérez. 2012. *Trichinella spiralis*: monoclonal antibody against the muscular larvae for the detection of circulating and fecal antigens in experimentally infected rats. *Experimental Parasitology*, 132(4):444-449