

## Evaluación de la técnica de inmunofluorescencia como diagnóstico para trichinellosis

Chávez-Ruvalcaba F.<sup>1\*</sup>, Benavides-Haro D.E.<sup>2</sup>, Rodríguez-Rodríguez A.M.<sup>1</sup>, Melero-Bañuelos V.<sup>1</sup>, Chávez-Ruvalcaba M.I.<sup>3</sup>

Universidad Autónoma de Zacatecas "Francisco García Salinas", <sup>1</sup>Licenciatura en Nutrición, Unidad Académica de Enfermería, <sup>2</sup>Unidad Académica de Medicina, <sup>3</sup>Unidad Académica de Ciencias Biológicas  
charuva@uaz.edu.mx

### RESUMEN

Debido a la importancia zoonótica de algunas enfermedades parasitarias, el principal esfuerzo en muchos países es el control y eliminación de estos de la cadena alimentaria (Naquira, 2010). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se han centrado inicialmente en los diez parásitos transmitidos por los alimentos con mayor impacto a nivel mundial FAO, 2016, dentro de ellos es de suma importancia el impacto de *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*). Los tratamientos para parasitosis no son altamente efectivos, por lo cual es importante plantearse como objetivo analizar la técnica de inmunofluorescencia en diferentes investigaciones como un adecuado diagnóstico para la Trichinellosis. Se evaluaron diferentes investigaciones propias y de otros autores para determinar si es adecuado el uso de esta técnica. Pudimos observar es sensible a la detección de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM en el diagnóstico de *Trichinella spiralis*, además que es gran utilidad para la detección a lo largo de la enfermedad y permite la evaluación de la cinética de inmunoglobulinas en la aplicación de inmunógenos.

Palabras clave: Inmunofluorescencia, Diagnóstico, Trichinellosis

### ABSTRACT

Due to the zoonotic importance of some parasitic diseases, the main effort in many countries is the control and elimination of these from the food chain (Naquira, 2010). The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO), have initially focused on the ten foodborne parasites with the greatest impact worldwide, FAO, (2016), Within them the impact of *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) is of utmost importance. Treatments for parasitosis are not highly effective, so it is important to consider the objective of analyzing the immunofluorescence technique in different investigations as an adequate diagnosis for Trichinellosis. Different own investigations and those of other authors were evaluated to determine if the use of this technique is appropriate. We were able to observe that it is sensitive to the detection of class IgA, IgG and IgM antibodies in the diagnosis of *Trichinella spiralis*, and that it is highly useful for detection throughout the disease and allows the evaluation of immunoglobulin kinetics in the application of immunogens.

Key words: immunofluorescence, diagnosis, Trichinellosis

Categoría: Microbiología y biotecnología

### INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han influido considerablemente en el curso de la historia del hombre y, según todos los indicios, seguirán haciéndolo a escala planetaria (Fuentes *et al.*, (2006)). Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen un problema sanitario y económico de relevancia mundial. Millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres (Ruiz *et al.*, (2017)). Los alimentos, el agua, el suelo y los fómites contaminados con heces son una de las principales vías de transmisión de parásitos al hombre (Petetta y Robles, 2012). Las complejidades de la epidemiología y ciclo vital de cada parásito juegan un rol fundamental en la identificación, prevención y control de los riesgos asociados con las enfermedades parasitarias transmitidas por alimentos (FAO/WHO, 2018).

Las enfermedades infecciosas causadas por parásitos transmitidos por los alimentos no recibieron el mismo nivel de atención de los riesgos biológicos y químicos transmitidos por los alimentos. Sin embargo, estas causan una gran carga de enfermedades en los humanos, pueden tener resultados prolongados, severos y a veces fatales, y conlleva una considerable dificultad en materia de seguridad alimentaria, seguridad, calidad de la vida e impactos negativos en los medios de vida (FAO/WHO, 2018). En cada parásito el diagnóstico a realizar ahora en lo que se refiere al diagnóstico inmunológico la Organización Mundial de la Salud ha hecho énfasis en la necesidad de profundizar los estudios para lograr una estandarización del diagnóstico

seguro y precoz de las infecciones parasitarias. La alta movilidad existente en las sociedades desarrolladas, los patrones de inmigración cambiantes, la alta morbilidad y mortalidad de algunas infecciones parasitarias deben considerarse a la hora de evaluar los métodos diagnósticos, sobre todo en ámbitos geográficos de alta prevalencia (Urdaneta, 2007).

La *Trichinella spiralis*, como todas las especies de *Trichinella*, tiene un ciclo vital especial en cuanto a que carece de una etapa de transmisión ambiental. Por lo tanto, todos los casos se deben a la ingesta de carne que contiene la larva enquistada. Los tipos de carne que suelen asociarse con la *T. spiralis* incluyen cerdo, equino y animales de caza. A nivel mundial, se informaron 65.818 infecciones en humanos entre 1986 y 2009, la mayoría de las cuales correspondieron a pacientes hospitalizados en Rumania, donde se reportaron 42 fallecimientos por esta causa. No obstante, puede haber un aumento en la exposición debido a nuevas tendencias en la conducta de humanos, por ejemplo, el consumo de carne de equino cruda, carne de perro, jabalíes silvestres y otras carnes de animales de la selva, así como la práctica de criar animales en libertad (los animales infectados son asintomáticos) (FAO/WHO, 2018).

La Trichinellosis es una enfermedad cosmopolita parasitaria y zoonótica que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, se transmite de modo accidental por la ingestión de carne o productos cárnicos insuficientemente cocidos procedente de animales infectados (Illic *et al.*, (2012), Gu *et al.*, (2013), Bruschi y Dupouy-Camet, 2014, Chu *et al.*, (2014), Cui *et al.*, (2014), Wang *et al.*, (2014), Wei *et al.*, (2015), identificada en Estados Unidos, Europa, Asia y países de Sudamérica, principalmente. Chile y Argentina, La fuente de infección habitual es el cerdo doméstico; sin embargo, en países europeos han reportado brotes epidémicos de caballo y jabalí, en países asiáticos se han identificado casos debido a la ingesta de carne de perro (Chávez, 2015).

La vigilancia de las enfermedades parasitarias se dificulta debido a la, por lo general, larga duración de los períodos de incubación, su naturaleza subclínica y las secuelas crónicas y no reconocidas. El contagio de enfermedades parasitarias transmitidas por alimentos se intensifica por cambios en la conducta humana, factores demográficos, medioambientales, climáticos, uso de suelo y comerciales, entre otras causas. (Broglia y Kapel, 2011).

El ciclo vital de *T. spiralis*, presenta 3 estadios: el estadio de larvas infectasteis (LI), adultos (macho y hembra) y larvas recién nacidas (LRN) Moreno *et al.*, (2009).

Los principales fármacos utilizados para tratar la parasitosis son los benzimidazoles, y actualmente se están buscando alternativas como los inmunógenos, principalmente el de 45kDa de *T. spiralis* para inducir una respuesta inmune protectora, así como para el diagnóstico precoz de Trichinellosis, al igual que el antígeno soluble total (AST) ya que es difícil porque sus manifestaciones clínicas son comunes con otras enfermedades en su mayoría gastroenteritis (Chávez *et al.*, (2016)).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se compararan diferentes estudios realizados con la técnica de inmunofluorescencia con la realizada en el presente artículo en el que. e utilizaron 42 murinos (ratas) hembras de la cepa Long Evans de aproximadamente 2 meses y medio de edad, 6 para la elaboración del inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* y 5 para cada uno de los grupos controles sanos e infectados y grupos experimentales: control sano (CS): al cual no se le dio ningún tratamiento, seis semanas después se sacrificaron, control infectado (CI): los murinos de dos meses y medios, se infectaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas, el tercer grupo, se inmunizó a 5 murinos de dos meses y medio por el método parenteral con el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0 (vía muscular), 7 (vía subcutánea), 14 (vía muscular) y 21 (vía peritoneal) días, a la 4 semana se retaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas, el cuarto grupo, se infectaron 5 murinos con aproximadamente 500 LI, después de 4 semanas postinfección se aplicó por el método parenteral el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0 (vía muscular), 7 (vía subcutánea), 14 (vía muscular) y 21 (vía peritoneal) días y se sacrificaron a las 6 semanas, el quinto grupo, se inmunizaron a 5 murinos por vía sublingual con el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0, 7, 14 y 21 días, a las 4 semanas se retaron con 500 LI de *T. spiralis* y se sacrificaron a las 6 semanas, el sexto grupo, se infectaron 5 murinos con aproximadamente 500 LI, después de 4 semanas postinfección se aplicó vía sublingual el inmunógeno de 45kDa de *T. spiralis* a los 0, 7, 14 y 21 días y se sacrificaron a las 6 semanas. Para la inmunización se tomó como día cero la cuarta semana de post infección.

A cada uno de los murinos se le realizaron 5 sangrados (preinfección o preinmunización y antemortem), por medio de seno venoso orbital con tubo capilar por presión con un volumen medio de 0.1-0.5 ml al animal anestesiado en cámara de gas con halotano (C<sub>2</sub>HBrClF<sub>3</sub>) los primeros 2 sangrados y por punción cardíaca

con un volumen mayor a 0.5 ml con animal anestesiado antes del sacrificio, obteniendo suero sanguíneo para realizar técnica de inmunofluorescencia. Los modelos animales utilizados para el trabajo experimental fueron manejados y sacrificados bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM) NOM-062-ZOO-1999 que contempla las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Del músculo infectado con LI de *T. spiralis* se obtuvo el Antígeno soluble total (AST) al cual se le realizó electroforesis en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PÁGE), reducido en condiciones del 10% geles de poliacrilamida. En la porción del gel que contenía el triplete característico de 42, 43 y 45 kDa se separó realizando por elución, con solución de Tris 10mM, a un pH de 8.13, adicionándole inhibidores de proteasa, posteriormente se homogenizo mediante centrifugación a 12,100 x gravedades a 4° C durante 30 min. La proteína que se obtuvo del sobrenadante, se le realizó la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente se filtró mediante las membranas que permitió el paso del péptido de 45 kDa, el sobre nadante se tomó para ser analizado por el SDS-EPPA reducido a 10%, en el gel para confirmar la presencia de este inmunógeno. Posteriormente estas fracciones se utilizaron como inmunógeno (Chapa *et al.*, 1992; Chávez, 2013). Se obtuvo secuenciación de la proteína por medio de una base de datos general del software ProteinLinx Global Server (PLGS), para después hacerlo con un método de proceso donde se usó la base de datos específica de *T. spiralis*, está fue obtenida de la Universal Uniprot-SwissProt donde se afirmó que los péptidos identificados tienen más del 95% de confiabilidad y masas exactas menores a 10ppm (Chávez, 2013). Se utilizaron muestras de 30g de tejido (masetero, lengua, intercostal, diafragma y pierna), se incubaron a 37°C, en un tamíz de tul en forma de saco, suspendido en una solución al 0.3% de pepsina (10,000 U) y HCl al 37% (0.2 M) en 500 ml de agua destilada, dentro de un embudo de separación, se esperó 24 horas para separar el paquete larvario con las LI, que se depositarán en el fondo de cada embudo y se observaron en una cámara de newbawer al microscopio óptico con lente 10X y se cuantifico el número de LI (Del Río and Herrera, 1986; García *et al.*, 2012; Lia *et al.*, 2014). Se realizó a todos los grupos experimentales determinación de características de célula nodriza. Por medio de la técnica de inmunofluorescencia se detectan complejos antígeno-anticuerpo usando anticuerpos anti-inmunoglobulina rata marcados con colorantes fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína. Estas sustancias al ser excitadas con luz de longitud de onda del rango ultravioleta 190-380nm, emiten luz visible que se observa como fluorescente en un microscopio de fluorescencia. Esta técnica es de sensible determinación de Inmunoglobulinas del tipo IgG, IgA e IgM, que nos permite definir la localización en la LI de *T. spiralis*. La técnica se implemento en fase líquida, en un ependorf se colocaron 15µl de LI de *T. spiralis* obtenidas por digestión artificial, lavadas anteriormente en una solución de PBS-Twen al 5%, con 1000µl de PBS, se realizan tres lavados por 5 minutos, se extraen 900µl de PBS en el último lavado y se incuba por 45min con 20µl del primer anticuerpo (suero problema), se hacen tres lavados más por 5 minutos con PBS y se incuba 45min más con 40µl del segundo anticuerpo (anti IgG, IgA e IgM) en una dilución de 1-1000, se hacen tres lavados, se colocó en un portaobjetos aproximadamente 1µl, se cubrió con portaobjetos y se examinó en el microscopio de fluorescencia. Si la reacción es positiva, se producirá la formación del complejo antígeno-anticuerpo (Venturiello *et al.*, 1998).

## RESULTADOS

Cruz *et al.*, (2018) menciona que la inmunofluorescencia indirecta es una técnica de alta sensibilidad, la desventaja de este método es que es operador dependiente y la confiabilidad de los resultados está directamente relacionada con la experiencia del observador, mientras que Fossaroli y Mortola, 2019 mencionan ventajas de esta técnica se encuentran su alta sensibilidad, rapidez y relativo bajo costo y concluye igual que la importancia del técnico es de suma importancia y posee menos especificidad que otras técnicas serológicas con lo son el ELISA y Western Blot. Algunos investigadores como Ilic *et al.*, (2014) aseguran que es la IFI es un método seguro para el diagnóstico de trichinellosis en una etapa temprana de la infección en humanos. Se reportaron positivos el 85% de los sueros analizados por IFI entre 20-30 días posinfección y el 100% entre los días 30-60 posinfección, y determinaron un retraso en detección de positivos al ser evaluados los mismos sueros por ELISA. Lo que sugiere una mayor sensibilidad de la técnica de IFI. Además, por IFI, registraron que pueden obtenerse resultados positivos a partir de muestras de equinos infectados hasta 32 semanas post infección.

Cui *et al.*, (2019) estudiaron una campesina B recombinante para tratar de inhibir el desarrollo de *T. Espirales*, reduciendo la fecundidad y la carga de gusanoo, 1 resultado de IFI reveló que la tinción de fluorescencia se detectó en las cuatro etapas del ciclo de vida (ML, IL1, 3 días de adulto femenino y

embriones) por anticuerpos anti-rTsCB. La fluorescencia se distribuyó en la cutícula y el esticosoma del nematodo y en los embriones dentro del útero femenino (Fig. 1). No se observó tinción de fluorescencia con suero preinmune.

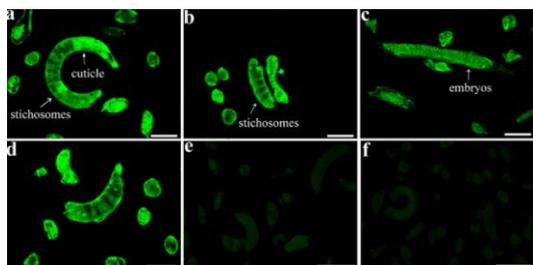


Fig. 1. Ubicación de TsCB de diferentes etapas del ciclo de vida de *T. spiralis* por IFI usando anticuerpo anti-rTsCB. Se detectó tinción de fluorescencia verde en la cutícula y el esticosoma de las larvas musculares (a) y las larvas ILL1 (b), hembras de 3 días y embriones (c). La larva muscular incubada por suero de infección se utilizó como control positivo (d). Las larvas musculares incubadas con sueros preinmunes (e) y PBS (f) se usaron como controles negativos (Cui *et al.*, (2019)).

Ren *et al.*, (2019), en su estudio donde caracterizaron molecularmente una proteína de 31 kDa de *Trichinella spiralis* para observar su protección inmune inducida en ratones BALB / c encontraron que por la técnica de IFI, se observó en diferentes etapas (ML, IL1, mujeres y hombres a 3 ppp) mediante el uso de suero anti-rTs31. La inmunotinción se localizó en la cutícula, el esticosoma de ML, IL1, 3 ppp macho y embriones de 3 ppp hembra (Fig. 2). No se observó tinción de fluorescencia en ML incubada con suero preinmune.

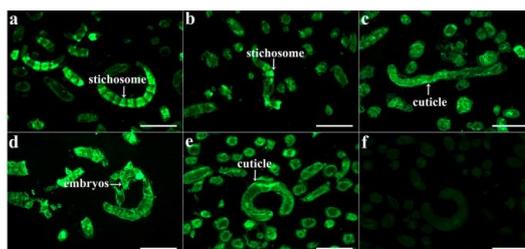


Fig. 2. Localización de tejido de Ts31 en varias etapas de *T. spiralis* por IFT usando suero anti-rTs31. La inmunotinción se distribuye en el esticosoma de ML (a) e IL1 (b), cutícula de 3 ppp macho (c) y embriones de 3 ppp hembra (d). El ML incubado con suero de infección se usó como control positivo (e), y el ML incubado con suero preinmune como controles negativos (f). Barras de escala: 100  $\mu$ m

Jiang *et al.*, 2019, en el estudio caracterización molecular de una enolasa *T. spiralis* y la interacción de esta con el plasminógeno del huésped encontraron por medio de la técnica de IFI en gusanos de *T. spiralis* detectados por suero anti-rTsENO, que se observó una tinción de inmunofluorescencia verde brillante en las epicutículas de *T. spiralis* en todas las etapas del ciclo de vida. Hubo una tinción de fluorescencia brillante en las cutículas de Larvas musculares y LRN, tal como sondeo con suero anti-rTsENO, mientras que no se detectó tinción en las cutículas de Larvas musculares incubadas con suero de ratón normal y PBS (Fig. 3).

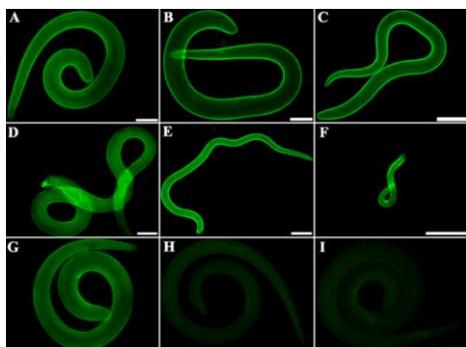


Fig. 3. Inmunolocalización de TsENO en diferentes etapas del desarrollo de *T. spiralis*. A – F IFA con gusanos intactos detectados por el suero anti-rTsENO. Hubo tinción de fluorescencia brillante en las cutículas de larvas musculares (A), 6 h Post infección (PI) (B), 24 h PI (C), 3 días PI (D), E y F control.

Sin embargo en nuestro estudio, los sueros de murinos obtenidos en los diferentes tiempos de las inmunizaciones y grupos fueron analizados por medio de inmunofluorescencia indirecta en microscopio confocal con anticuerpos monoclonales IgA, IgM, IgG y policlonal (IgA, IgM, e IgG), donde se pudo observar la interacción de los anticuerpos presentes, en base a los controles negativos y positivos, y como se ha llevado a cabo en cortes histológicos por otros autores, los sueros que marcaban una uorescencia en la cutícula y esticosoma son determinados como positivos y en los que no había uorescencia o solo se presentaba en el esticosito se clasificaron como negativos (Fig. 4).

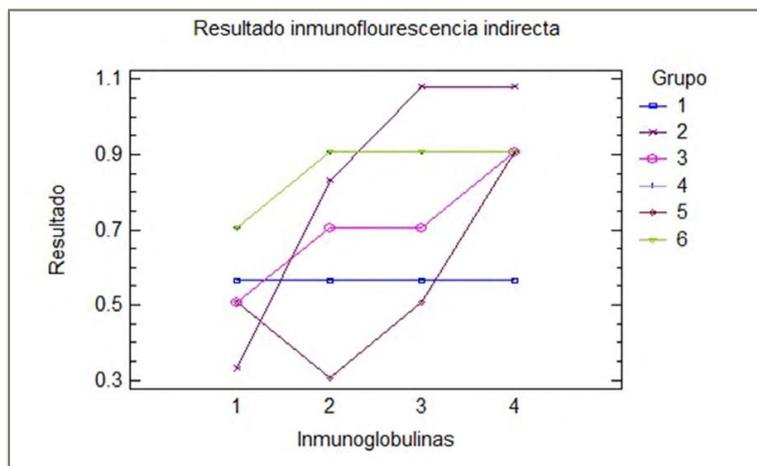


Fig. 4. Resultados de inmunofluorescencias indirectas de los grupos experimentales. Realizada en el programa stargraphics centurión por medio de análisis de varianza, donde en el eje de las x (inmunoglobulinas) es 1 (IgA), 2 (IgM), 3 (IgG) y 4 (Policlonal), donde nos muestra que la técnica de inmunofluorescencia indirecta es específica y sensible a la detección de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM en el diagnóstico de *T. spiralis*.

Como se puede observar en la Figura 5, no se presenta fluorescencia en ninguna de las muestras con ningún anticuerpo (G1A, G1M, G1G y G1P), con respecto al control infectado, mientras que el control infectado a las 24 h postinfección solo se identificó por medio de IgM (G224hM), a partir de los 15 días postinfección la IgG y con el anticuerpo policlonal dieron positivos por inmunofluorescencia y se mantuvo a los 28 días y las seis semanas, mientras que por el anticuerpo IgA no se presentó interacción antígeno-anticuerpo.

En el grupo tres (inmunizado vía parenteral y retado con 500 LI), por medio del anticuerpo policlonal (IgA, IgG e IgM) se identificó desde la primera inmunización, el anticuerpo IgA durante la primera y segunda inmunización descendiendo en la tercera y cuarta inmunización y volviéndose a presentar al momento del reto, mientras que la IgM hizo interacción a partir de la segunda inmunización presentándose hasta el reto, con el anticuerpo IgG este al igual como se menciona en la literatura presentó positividad hasta la tercera inmunización manteniéndose hasta el reto.

Los sueros analizados del grupo 4, fueron principalmente positivos desde la primera inmunización hasta el sacrificio, con cada una de las inmunoglobulinas, con excepción de la 1ra inmunización después de la infección con la inmunoglobulina IgA, manteniéndose la respuesta inmunitaria después de la infección debido a la estimulación de las inmunizaciones subsecuentes (Fig. 4 y 5).

A diferencia con la inmunización parenteral, en la sublingual se pudo observar la interacción con la IgA, desde la tercera inmunización manteniéndose hasta el reto, por lo cual ocurre la estimulación de la respuesta inmune humoral a nivel de mucosas y permite que el parásito adulto que se encuentra en estómago (etapa entérica), pueda ser eliminado con mayor éxito, al analizarse con IgM se observó en inmunización sublingual una interacción en la cuarta inmunización, mientras que en la parenteral desde la tercera, las muestras analizadas con IgG y policlonal se presentan igual tanto por vía sublingual como en la parenteral (Fig. 4 y 5).

A diferencia del grupo cuatro (infección e inmunización parenteral), en el grupo seis (infección e inmunización sublingual) no se identificó la interacción antígeno anticuerpo con IgA en la primera inmunización, siguiendo el mismo patrón con IgM, IgG y policlonal en los diferentes tiempos de inmunización (Fig. 4 y 7), dando positivos en cada uno.

Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos con el programa Stargraphics Centurion. En el ANOVA simple teniendo como variable dependiente larvas y como factor, los grupos de tratamiento se realizaron 180 observaciones, presentando un  $p < 0.05$  mostrando que es estadísticamente significativo, con

un nivel de confianza del 95 %, mostrando que el diagnóstico con inmunofluorescencia para *T. spiralis* es altamente significativo y puede utilizarse como diferencial de otros tipos de parasitosis.

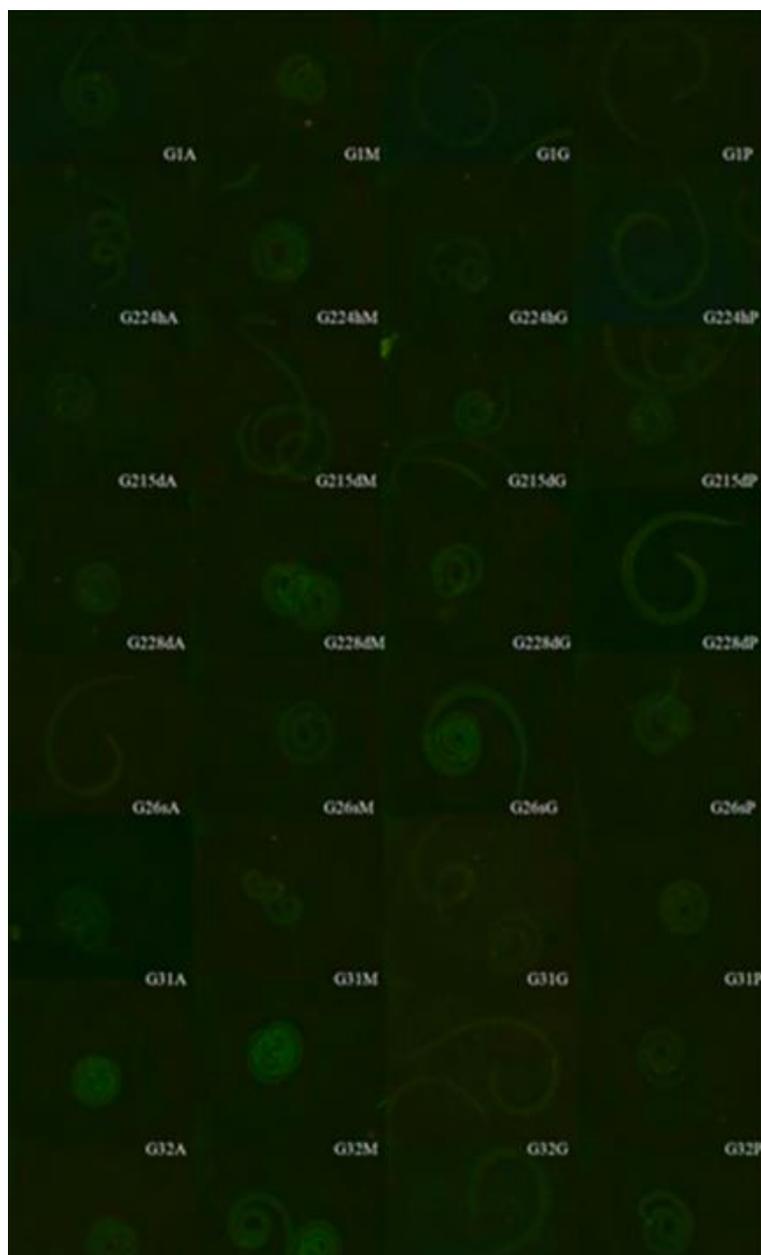


Figura 5. Inmunofluorescencia en sueros de grupo 1, grupo 2 y grupo 3. G1(Grupo 1, control sano), G2 (Grupo 2, control infectado), G3 (Grupo 3, inmunizado vía parenteral e infectado), 24h (24 horas PI), 15d (15 días PI), 28d (20 días PI), 6s (6 semanas PI), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

## DISCUSIÓN

La inmunoterapia activa para combatir la Trichinellosis se ha utilizado a través del tiempo con gran éxito. Chávez *et al.*, 2016 (utilizó antígeno soluble total para modificar el implante de LI enquistadas de *T. spiralis* en músculo estriado de cerdo, obteniendo como resultado que los animales que recibieron inmunoterapia subieron de peso 10 kg como promedio, su pelo se hizo brillante y menos erizo, en la compresión inicial, al observarla al microscopio de luz, se encontraron LI de *T. spiralis* calcificadas. Posterior a la inmunoterapia, hubo un aumento de vascularización, aumento de acúmulos de grasa, aumento de polimorfonucleares y disminución del número de LI calcificadas, lo cual llevo a utilizar otro modelo experimental, Moreno, 2000 realizó un estudio donde se utilizaron antígenos solubles totales de *T. spiralis* en rata, lo que permitió una reducción en la carga parasitaria y daño a la célula nodriza y la larva infectante, concordando con Laredo *et*

*al.*, 2012, que inmunizaron ratas Long Evans con AST de *T. spiralis* y sacri cada a diferentes tiempos, encontrando una disminución en la carga parasitaria, mostrando un efecto protector contra la parasitosis, observándose la pérdida de espiral y modificación del quiste del parásito, debido a los resultados obtenidos en estos dos modelos y detectándose tanto en los grupos experimentales como en los controles infectados, un triplete característico de *T. spiralis*, Maldonado *et al.* (2007), utilizaron Ag de *T. spiralis* de 45 kDa en rata, con lo que pudo obtener una disminución en la carga parasitaria, inhibición en la implantación del parásito, y daño a la célula nodriza, lo cual condujo a probar el antígeno inmunoprotector por dos diferentes vías: la parenteral y la sublingual, encontrando una disminución del 50 % en la sublingual con respecto al control infectado, Bautista (2004), realizó un experimento donde se aplicó Ag de *T. spiralis* con *Lactobacillus casei* en ratón BALB/c, para lograr la protección contra la infección y la disminución de carga parasitaria.

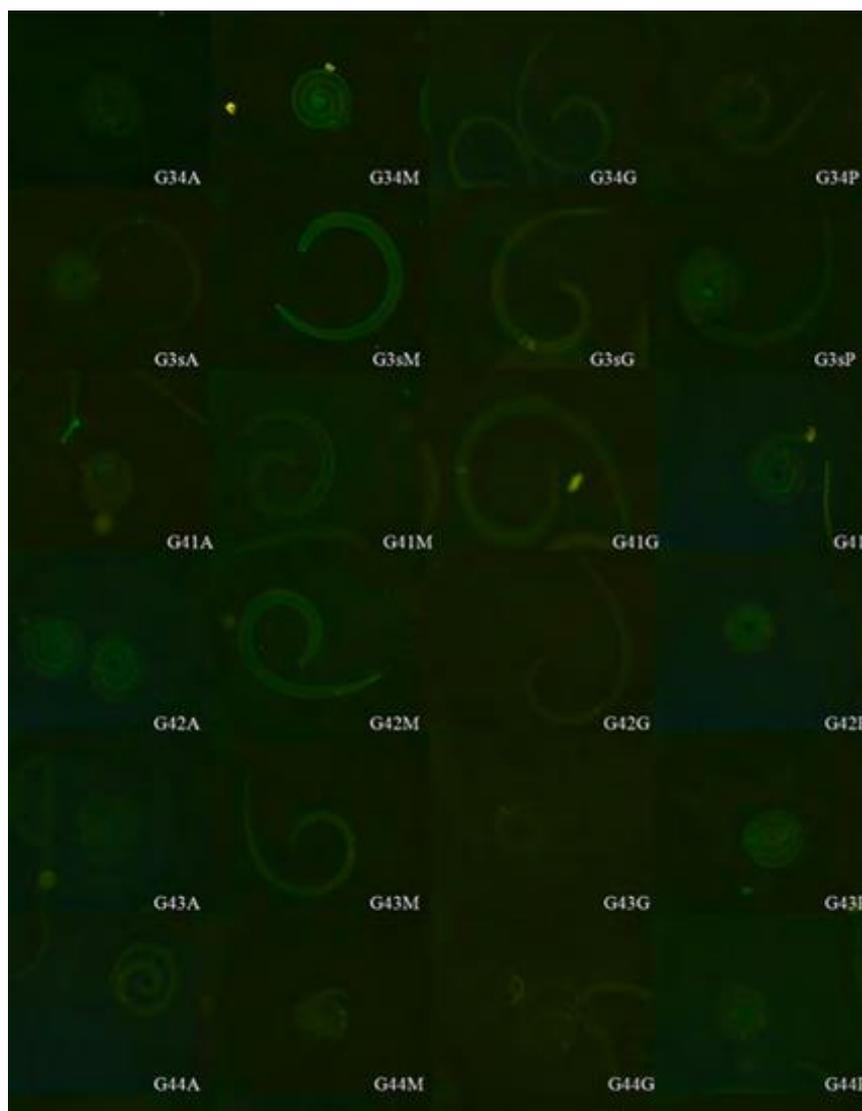
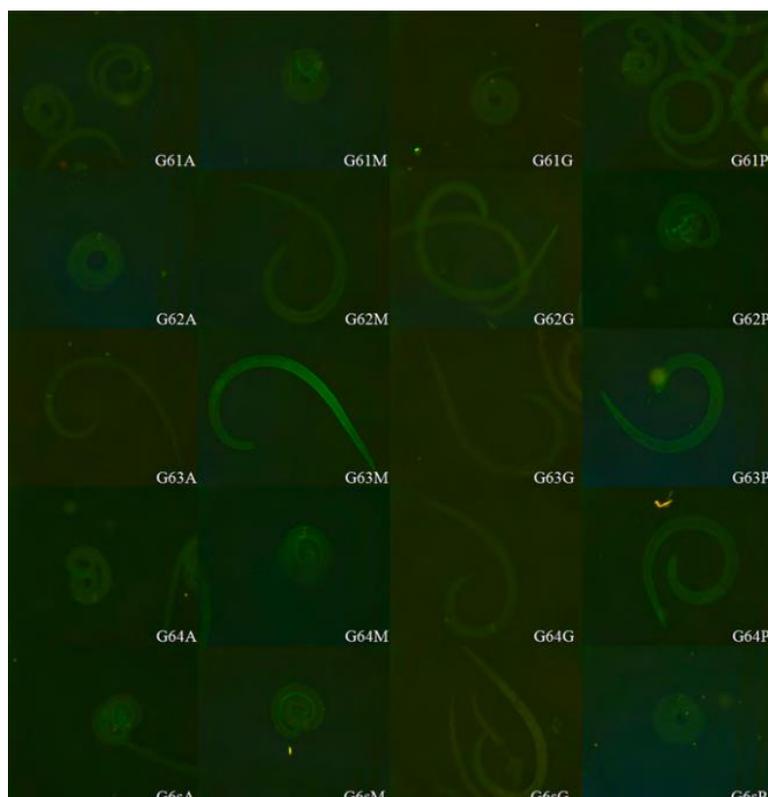


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta en sueros de grupo 5. G5 (Grupo 5, inmunizado vía sublingual e infectado), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización), S (sacri cio), A (IgA), M (IgM), G (IgG).

Dea (2006), logró la disminución de la carga parasitaria por medio de la utilización de Ag TSL1 en copolímeros de ratón y Gamble (1985), utilizó Ag purificados con Ac monoclonales de ratón, con lo que pudo observar una disminución en la cantidad de parásitos intestinales, menos fecundación de la hembra adulta y menos carga parasitaria. Chávez (2013) comparó el AST de *T. spiralis* con el inmunógeno de 45kDa observando una mejor respuesta inmunológica con el inmunógeno, por lo cual en el presente estudio se optó por utilizarlo por diferentes vías de

inmunización para evaluar la presencia de IgA, IgM e IgG anti-*T. spiralis* a diferentes tiempos de inmunización.

Wei *et al.* (2011) presentaron un antígeno protector que induce inmunidad parcial contra la infección por *T. spiralis* en ratones BALB/c, mientras tanto Cui *et al.* (2014) caracterizaron 12 Ac monoclonales, de los cuales diez reconocieron por medio de Western blot bandas entre 19,3-119,8 kDa (principalmente 28,7-68,4 kDa), con la generación y caracterización de estos, proporcionan bases para el desarrollo de técnicas de diagnóstico serológico específicas para trichinellosis, Yang *et al.* (2014) purificaron y evaluaron una proteína recombinante TsDAF-21 como potencial antígeno por Western blot el cual fue reconocido en suero de ratones a los 14, 21 y 28 días PI no así en la etapa temprana de la infección (siete días). Wei *et al.* (2015) clonaron e identificaron un gen Tspst en un sistema de expresión de *E. coli*, que codifica una proteína de 29 kDa la cual tiene una buena inmunogenicidad en ratones y se puede utilizar como un inmunógeno para producir anticuerpos. Ilic *et al.* (2014) consideran que la prueba estándar de oro por serología para el diagnóstico de *Trichinella* es Western blot para distinguir los antígenos de reacción cruzada diferencia de técnicas comúnmente utilizadas como lo son inmunofluorescencia indirecta y ELISA. La técnica de Western blot ha sido utilizada de forma industrial para el diagnóstico de *T. spiralis*, Yera *et al.* (2013) utilizaron la técnica para evitar reacciones cruzadas observadas con inmunofluorescencia indirecta y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas, utilizaron antígenos de extractos crudos de *T. spiralis* para analizar 60 sueros de pacientes con *T. spiralis*, 11 sueros de pacientes sanos y 51 sueros de pacientes con otras enfermedades parasitarias (cisticercosis, esquistosomiasis, strongyloidosis, fascioliasis, toxocariasis, amebiasis hígado, anisakiasis, lariasis, la toxoplasmosis, la hidatidosis, malaria), bandas de 43, 44 y 64 se



encontraron en 51 sueros con *T. spiralis* y cuatro de nueve sueros de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad.

Figura 7. Inmunofluorescencia indirecta en sueros de grupo 6. G6 (Grupo 6, infectado e inmunizado vía sublingual), 1 (primera inmunización), 2 (segunda inmunización), 3 (tercera inmunización), 4 (cuarta inmunización), s (sacrificio), A (IgA), M (IgM), G (IgG), P (Policlonal: IgA, IgM, IgG).

En el estudio realizado en el Laboratorio Nacional de Referencia de Serbia para la detección de Trichinellosis en sueros de diferentes hospederos (humano, caballo, cerdo y perro) por la técnica de western blot, se pudo apreciar la presencia de una tríada de bandas con masas moleculares de 45, 49 y 53 kDa, esta misma tríada reconocida por un anticuerpo monoclonal específico 7C2C5 (Ilic *et al.*, 2014) e identificada en nuestro

estudio en los sueros controles a partir de los 21d PI hasta las seis semanas, en los grupos 3 y 5 al reto con LI y en los grupos 4 y 6 desde la infección y durante las cuatro inmunizaciones con la proteína de 45kDa y la inmunofluorescencia con el anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG) al igual que con el anticuerpo de IgG. Radovic *et al.* (2012) realizaron transferencias por western de antígenos de ES de *T. spiralis* para determinar qué componentes parasitarios fueron responsables de la reactividad cruzada observada por IFI, de sueros con autoanticuerpos y sueros infectados con *T. spiralis*, para determinar que antígenos podían estar conservados evolutivamente en el parásito y en hospedero, se pudo observar que el suero positivo control, que contenía anticuerpos específicos anti-*Trichinella* reconocía bandas de 45, 49 y 53 kDa (la tríada-*Trichinella* específica) que contiene el epítipo inmunodominante para la etapa de larvas musculares del género *Trichinella*, mientras que el realizado en suero con autoanticuerpos reacciono con uno o dos de las bandas en esta tríada, por lo cual el patrón de bandas observado en transferencias de Western blot realizadas con los sueros que contienen autoanticuerpos difería del patrón obtenido usando los sueros positivos de *T. spiralis*.

En inmunizaciones con AST de *T. spiralis* se detectó por medio de western Blot el 60 % de sueros inmunizados y posteriormente se reto con LI de *T. spiralis* los cuales fueron todos positivos, al igual que en nuestro trabajo por medio del western blot con el anticuerpo policlonal (IgA, IgM e IgG), (Moreno *et al.*, 2012).

## CONCLUSIÓN

La técnica de inmunofluorescencia es sensible a la detección de anticuerpos de clase IgA, IgG e IgM en el diagnóstico de *Trichinella spiralis*, además que es gran utilidad para la detección a lo largo de la enfermedad y permite la evaluación de la cinética de inmunoglobulinas en la aplicación de inmunógenos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Broglia A y Kapel C. 2011. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of food-Borne parasitic zoonoses. *Veterinary Parasitology*. Num. 182. Pp: 2-13.
2. Brushi F. y Dupouy-Camet J. 2014. Helminth Infections and their impact in global Health. Vol. 10. Num. 2, Pp: 13-21
3. Chávez F. 2015. Comparación de tratamiento farmacéutico en Trichinellosis en modelo murino. *Epidemiología y Tratamiento de Trichinellosis en México*. Editorial Académica Española. Vol 1. Pp: 209-221
4. Chávez F, Chávez MI, Hernández CE, Muñoz JJ, Moreno MA. 2016. Evaluación por medio de intermorreacción de la aplicación del inmunógeno de 45kDa de *Trichinella spiralis* para el diagnóstico de Trichinellosis. *Revista Parasitología Latinoamericana*. Vol 65. Número 2. Pp: 29-36
5. Chávez F, Chávez MI, Hernández CE, Muñoz JJ, Muñoz JL, Moreno MA. 2016. Evaluation of Anti-*Trichinella spiralis* Obtained by Sublingual and Conventional Immunizations with the 45kDa Protein. *Acta Biologica Colombiana*. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n2.56809>
6. Chu KB, Kim S, Lee SH, Joo KH, Lee K, Lee Y, Zheng S, Juan F. 2014. Enhanced protection against *Clonorchis sinensis* induced by co-infection with *Trichinella spiralis* in rats. *Parasit Immunol*. Vol. 36. Pp: 522-530
7. Cui J, Wang I, Sun G, Liu LN, Zhang SB, Jiand P, Wang Z, 2014. Characterization of *Trichinella spiralis* 31 kDa protein and its potential application for the serodiagnosis of Trichinellosis. *Acta Tropical*. Num. 142 Pp: 273-287
8. Cruz S, Chavarro G, Pulido M. 2018. Métodos de detección de trichinelosis en cerdos. *Revista Logos, Ciencia y Tecnología*. Vol. 10. No. 1. <https://revistalogos.policia.edu.co:8443/index.php/rlct/article/view/430/pdf>
9. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2017. Identifican los diez principales parásitos transmitidos por los alimentos. <http://www.fao.org/news/story/es/item/237578/icode/>
10. FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud). 2018. Ranking basado en múltiples criterios para la gestión de riesgos de parásitos transmitidos por alimentos. Número 23. <http://www.fao.org/3/I3649ES/i3649es.pdf>
11. Fossaroli M y Mortola E. 2019. Revisión bibliográfica de los diferentes métodos de diagnóstico, de laboratorio para Trichinellosis porcina. *Diagnóstico Veterinario de Laboratorio*. Universidad Nacional de la Plata. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/80620/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/80620/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
12. Gao Y, Wang R, Liu M. 2010. *Trichinella spiralis*, potential model nematode for epigenetics and its implication in metazoan parasitism. *Front Physiol*. Vol 4. Pp: 1-5
13. Gu Y, Wei J, Yang J, Huang J, Yang X, Zhu X. 2013. Protective Immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a Multi-epitope Vaccine in a Murine Model. *PLoS ONE*. [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
14. Jian P, Zao Y, Yan S, Yan Y, Yang D, Yuan L, Dan R, Zhang X, Wang Z, Cui J. 2019. Molecular characterization of a *Trichinella spiralis* enolase and its interaction with the host's plasminogen. *Veterinary research*. [https://www.researchgate.net/publication/337777027\\_Molecular\\_characterization\\_of\\_a\\_Trichinella\\_spiralis\\_enolase\\_and\\_its\\_interaction\\_with\\_the\\_host's\\_plasminogen](https://www.researchgate.net/publication/337777027_Molecular_characterization_of_a_Trichinella_spiralis_enolase_and_its_interaction_with_the_host's_plasminogen)
15. Illic C, Liu M, Bai X, Liu P, Wang X, Li T. 2012. Characterisation of a plancitoxi-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol 8. Número 8. Pp: 46-42
16. Ilic N., Gruden-Movsesijan A, Zivojinović M., Sofronić-Milosavljević L. 2014. Characteristic band pattern in Western blots for specific detection of anti-*Trichinella spiralis* antibodies in different host species. *Acta Veterinaria – Beograd*. 64 (1): 33-43.
17. Lia C, Liu M, Bai X, Liu P, Wang X, Li T. 2014. Characterisation of a plancitoxi-1-like DNase II gene in *Trichinella spiralis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Vol 8. Pp: 1-8
18. Maldonado TC, Reveles RG, Saldivar ES, Muñoz JJ, Morales MV, Moreno MA. Evaluación del efecto protector de 2 inmunógenos de *Trichinella spiralis* en ratas long Evans con modificación nutricional e infectado con *Trichinella spiralis*. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2007: 26(2):110-114.

19. Naquira C. 2010. Las zoonosis parasitarias: Problemas de Salud Pública en el Perú. Revista Peruana Experimental Salud Publica. Volumen 27, Número 4. Pp: 494-497
20. Ren HN, GuO KX, Zhang Y, Sun Q, Liu R, Jian P, Zhang X, Wang L, Cui V y Wang Z. 2018. Molecular characterization of a 31 kDa protein from *Trichinella spiralis* and its induced immune protection in BALB/c mice. Parasites y Vectors. Vol. 11. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3198-5>
21. Ruiz MJ, Coello R, Padola N, Etcheverria A. 2017. Inhibitory capacity of *Lactobacillus* spp. against pathogens involved in foodborne diseases. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 49, Issue 2, Pp: 174-177
22. Wang L, Cui J, Hu D, Lui R, Wang Z. 2014. Identificatio of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. Parasites y Vectors. Vol 2. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-76>
23. Wei Y, Ling GL, Run DL, Ge GS, Chun YL, Shuai BZ. 2015. Molecular identification and characterization of *Trichinella spiralis* proteasome subunit beta type-7. Parasites y Vectors. Pp: 8-18
24. Yang J, Pan W, Sun X, Zhao X, Yuan G, Sun Q. Immunoproteomic pro le of *Trichinella spiralis* adult worm proteins recognized by early infection sera. Parasit Vectors. 2015;8:20. Doi:10.1186/s13071-015-0641-8