

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN CEPAS DE *Trichinella*
spiralis OBTENIDAS DE CABALLOS DE DOS REGIONES GEOGRÁFICAS DE
MÉXICO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A:

M. V. Z. GABRIEL URIBE GUTIERREZ

CODIRECCIÓN:

Dra. Lilian Yépez Mulia

Dr. Humberto González Márquez

Asesor:

M. en S. P Francisco Ramón Gay Jiménez

MÉXICO, D. F., OCTUBRE 2007.

COMITÉ TUTORAL

Cotutora:

Dra. Lilian Yépez Mulia

Laboratorio de Parasitología,
Unidad de Investigación Médica
en Enfermedades Infecciosas y
Parasitarias, Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

lilianyeppez@yahoo.com

Cotutor:

Dr. Humberto González Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
UAM - Iztapalapa.

hgm@xanum.uam.mx

Asesor:

M en S. P. Francisco Ramón Gay Jiménez

Departamento de Producción Agrícola y Animal,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
UAM - Xochimilco.

gayjfr@hotmail.com

Este trabajo fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Parasitología, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS. Laboratorio Veterinario de Ciencias de la Carne y Salud Pública, Departamento de Producción Agrícola y Animal, CBS, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco y el Laboratorio de Expresión Génica, CBS, Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrados del CONACYT.

La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca-crédito otorgada durante el periodo 2004-2005 por parte de CONACYT con el No. de registro 185606.

El proyecto fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, Dirección de Prestaciones Médicas, Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud, Coordinación de Investigación en Salud, División de Desarrollo de la Investigación, con una beca de investigación No. 99092378, durante el periodo 2006.

“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **Análisis de la variabilidad genética en cepas de *Trichinella spiralis* obtenidas de caballos de dos regiones geográficas de México**, con fecha 26 de octubre del 2007”.

JURADO DE EXAMEN

Presidente:

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM – Iztapalapa.

Secretario:

M en S. P. Francisco Ramón Gay Jiménez

Profesor Titular C, Departamento de Producción Agrícola y Animal
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM – Xochimilco.

Vocal:

M en B. E. Guillermina Campos Valdéz

Investigador Asociado A, Laboratorio de Investigación en Parasitología,
Hospital Infantil de México, Federico Gómez, SS.

Dedicatoria

*Con amor, respeto y admiración a mis padres Tomas y Socorro, por
guiar a cada uno de mis hermanos y a mi en el camino de la vida, por
apoyarme siempre, por sus enseñanzas y consejos y hacerme un hombre
responsable y sobre todo por que nunca terminara su labor de ser padres...*

*A mis hermanos Miguel, Félix, Talina, Tomas y Daniel, por
apoyarme en todo momento y no dejarme solo en el camino.....los quiero y
los admiro.....*

*A Guille por dedicar su tiempo y apoyarme siempre que lo necesite,
por ser parte importante en mi vida.....con cariño, respeto y
admiración.....*

Agradecimientos

Expreso mi más sincera gratitud y un cumplido reconocimiento a la Dra. Lilian Yépez Mulia, quien siempre mostró su disposición y apoyo incondicional y por que desde el principio y hasta el final me apoyo.

Especial agradecimiento al Dr. Francisco Ramón Gay Jiménez, por sus enseñanzas teóricas y constante estímulo, que permitieron que logra esta meta, que sin duda quedaran plasmadas en este documento.

Un cumplido agradecimiento al Dr. Humberto Gózales Márquez, por formar parte de este trabajo, por su apoyo, por sus enseñanzas académicas, por su valiosa disposición y por dejarme ser independiente en el laboratorio.

Al Dr. Edmundo Bonilla González, por sus valiosas observaciones y comentarios en el laboratorio. Al Dr. Rafael Zubillaga por apoyarme con su equipo,

Al Dr. Pablo G. Damián Matzumura, por sus consejos, por su amistad y por su dedicación a la Docencia.

A todo el personal del laboratorio de parasitología, Dra. Samira, Rosita, Lety, Chucho, Amparo, Chela, Alfonso, Paquito, por su apoyo y agradable compañía. A Ericka por sus cometarios y por su valioso ayuda en el laboratorio. Al personal del laboratorio de Biología Molecular y Bacteriología por su ayuda gracias.....

A mis compañeros y amigos de maestría, Varenka, Inés, Ángeles, Elsa, Xochitl y Alejandro.

A mis amigos de la UAM, Juan, Raúl, Ana, Fer, Francisco, Iván, Zayil Menandro.

Índice General

Índice General	vi
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Glosario	xv
Abreviaturas	xviii
Resumen	xviii
Abstract	xx
Introducción	1
Definición	2
Agente etiológico	2
Taxonomía	3
Morfología	4
Ciclo de vida	9
Epidemiología	11
El ADN ribosomal (ADNr) como marcador filogenético y de clasificación.....	16
Antecedentes	18
Justificación.....	27
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
Hipótesis	29
Material	30
Enzimas	30
Oligonucleótidos	30
PRC múltiplex	30
PCR sencillo (para amplificar secuencias del fragmento 1.6 Kb reportado para <i>T. spiralis</i> /pPRA)	31
PCR sencillo con oligonucleótidos oTsr 1 y 4 (iniciadores I, en Tabla 3)	31
PCR-SSCP	31
Nucleótidos	31

Estuches comerciales	31
Métodos	32
Diseño Experimental.....	32
Calculo del tamaño de la muestra.....	32
Toma de muestras.....	34
Digestión artificial.....	35
Extracción de ADN	36
Análisis de las muestras mediante PCR múltiplex.....	37
Análisis de las muestras mediante PCR empleando la secuencias pPRA	38
Electroforesis en gel de agarosa	38
Polimorfismo en la Conformación de Cadena Sencilla no radiactivo (SSCP's) .	38
Análisis de datos del SSCP's.....	40
Resultados	42
Análisis de las muestras de caballo por digestión artificial	42
Extracción de ADN	42
Determinación de la presencia y caracterización de la especie de <i>Trichinella spiralis</i> en músculo de caballo mediante PCR múltiplex.....	43
Determinación de la presencia de <i>Trichinella spiralis</i> en músculo de caballo empleando la secuencia pPRA.....	47
Determinación de la variabilidad genética de <i>T. spiralis</i> en las muestras colectadas.....	50
Discusión.....	57
Conclusiones.....	63
Perspectivas.....	64
Bibliografía	65
ANEXO I.....	75
ANEXO II.....	79

Índice de Tablas

Tabla 1. Especie y genotipos de <i>Trichinella</i> identificados. Distribución y animales que afectan.	3
Tabla 2. Especies y genotipos de <i>Trichinella</i>	18
Tabla 3. Iniciadores empleados en el ensayo de PCR múltiplex (Sigma Genosys Parking Slip).	30
Tabla 4. Muestreo sumatorio.	34
Tabla 5. Matriz de variables cualitativas que indican la ausencia (0) y presencia (1) para el número de bandas únicas identificadas a partir del control porcino positivo y en las muestras analizadas.	54
Tabla 6. Evaluación de las relaciones (comparación genética) entre (individuos). el control positivo de <i>T. spiralis</i> con las muestras positivas de caballos y los aislados obtenidos de cerdo del Estado de Zacateca, expresada en proporción. Los valores en 0 indican que no hay diferencias.	55
Tabla 7. Tasa de polimorfismo para cada una de las bandas obtenidas de los SE-V en las muestras analizadas por SSCP's y proporción de loci variables de la población.	56

Índice de Figuras

Figura 1. Adulto macho de <i>T. spiralis</i> . Tomado de: http://www.trichinella.org	5
Figura 2. Adulto hembra de <i>T. spiralis</i> . Tomado de: http://www.trichinella.org	6
Figura 3. Esquema de la célula nodriza en tejido muscular. Tomado de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm	7
Figura 4. Larva Muscular de <i>T. spiralis</i> , fase infectiva. Tomado de: http://www.trichinella.org	8
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Trichinella spiralis</i> . Tomado de: Despommier y col., 2005. Parasitic Diseases. 5 Th Ed. Apple Tress Producciones, LLC. New York.	10
Figura 6. Regiones donde se han reportado casos de <i>Trichinella</i> en humanos y animales (Medline, 1965-1999, en Dupouy-Camet, 2000).	11
Figura 7. Diagrama del fragmento de ADN repetitivo de 1.6 Kb, de <i>T. spiralis</i> indicando las regiones de alineamiento de los iniciadores pPRA en el PCR. A1 [5'GTAAAGCGGTGGTGC GTATTCCAT3'] y B1 [5'AGTTTGCATACCGAACCAACCGCTC3']. B2 y B3 indican que el oligo B1 tiene sitios de unión con secuencias homologas de 76 y 57% respectivamente. Los números (pares de bases) indican la posición del iniciador en el extremo 5' de la secuencia pPRA, las flechas indican la región y dirección de la secuencia complementarias en donde los iniciadores se unen. Adaptado de Dick y col., 1992.	21
Figura 8. Productos de PCR de 13 aislados de <i>T. spiralis</i> usando los iniciadores pPRA. Carril 1, aislado de cerdo; Carril 2, de osos negro de Pennsylvania; Carril 3, colectado de cerdo de Canadá; Carril 4, PenR1; Carril 5, rata de Nueva Zelanda; Carril 6, PB; Carril 7, PenP3 rata; Carril 8, rata de Hong Kong; Carril 9, gato de Londres; Carril 10, TRLL; Carril 11, gato de España; Carril 12, P1; Carril 13, aislado de humano en Japón. La heterogeneidad del fragmento de 1.6 Kb se observa en el carril 3, donde el	

fragmento de 1,200 pb presenta un bajo número de copias. En el carril 5 y 8 los dos aislados de rata no presentan éste fragmento. En el aislado japonés no se amplificó el fragmento de 1.6 Kb. Tomado de Dick y col., 1992..... 22

Figura 9. Amplificación del segmento de expansión 5 del ADNr de *Trichinella* por PCR utilizando los iniciadores oTsr 1 y 4, a partir del ADN genómico obtenido de: 1) *T. spiralis*; 2) *T. nativa*; 3) *T. pseudospiralis*, Rusia; 4) *T. pseudospiralis*, Norte América; 5) *T. pseudospiralis*, Australia; 6) control negativo hígado de ratón. Tomado de: Zarlenga y col., 1996..... 24

Figura 10. Origen de los iniciadores utilizados en el PCR múltiplex y tamaño de los productos de PCR que se obtienen con cada uno de ellos para cada una de las especies de *Trichinella*. A) Tabla que indica el tamaño de los productos que se obtiene para cada un de las especies y genotipos del parásito, con los iniciadores oTsr 1y 4, además de cuatro juegos de oligos más. B) Peso de los productos de PCR amplificados con los iniciadores de la Tabla A. Abreviaturas: L, marcadores de peso molecular (PM) de 100 pb; Carril 1, *T. spiralis* (Ts); Carril2, *T. nativa* (Tna); Carril 3, *T. britovi* (Tb); Carril 4, *T. pseudospiralis* (Tps) de la región Nórdica (Ne); Carril 5, *T. pseudospiralis*, Peleártica (Pa); Carril 6, *T. pseudospiralis*, Australia (Au); Carril 7, *T. murrelli* (Tm); Carril 8, *Trichinella* T6 (T6); Carril 9, *T. nelsoni* (Tne); Carril 10, *T. papuae* (Tpa) y *Trichinella* T11 (T11). Tomado de: Pozio y La Rosa, 2003..... 25

Figura 11. ADN obtenido del tejido muscular de caballos A) con la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico y B) con el estuche comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System. El ADN de las muestras de músculo se extrajo paralelamente con las dos técnicas. El rendimiento e integridad del ADN, fue más eficiente con la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico ya que se obtienen concentraciones superiores a los 800 ng/μL/0.5 g de tejido. Con el estuche comercial se obtienen concentraciones de 300 a 500 ng/μL/0.5 g de tejido. En ambos geles se

- cargaron 5 μ L de muestra en cada carril. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL. 42
- Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR múltiplex amplificados del ADN genómico obtenido de LM de *T. spiralis*, a diferentes concentraciones de ADN inicial del control positivo. Marcadores de peso molecular (PM) de 50 pb. Se observa un fragmento de 173 pb, que corresponden al SE-V del ADNr de *T. spiralis*..... 43
- Figura 13. Análisis de 28 muestras de ADN obtenido de diafragma de caballos del matadero San Vicente mediante PCR múltiplex. No existe ninguna muestra positiva. PM 100 pb. Carril 1, control positivo LM de *T. spiralis*; Carril 2, control negativo ADN de ratón no infectado; Carril 3 y 4, control negativo con 500 y 1000 ng de ADN de caballo no infectado; Carril 5, control reactivos. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 173 pb, pertenece a la secuencia del SE-V del ADNr de *T. spiralis*. Gel de agarosa al 2%..... 44
- Figura 14. Análisis de 15 muestras de ADN obtenido de carne de caballos por PCR múltiplex, que en un estudio previo resultaron positivas a *T. spiralis* con secuencias pPRA. Se observa un fragmento amplificado de 173 pb correspondiente al SE-V del ADNr de *T. spiralis* en el control positivo. En el resto de las muestras no se obtuvo el producto de amplificación, indicando que son negativas. PM: 100 pb; Carril 1, control positivo LM *T. spiralis*; Carril 2, control negativo ADN de ratón no infectado; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4, control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos originarios del Edo de San Luís Potosí. Carril 8-19: caballos procedentes de Edo. de Veracruz. Gel de agarosa al 2% 45
- Figura 15. Análisis del ADN de músculos de caballo de los mataderos San Vicente y Río Frío, con PCR usando los iniciadores pPRA. Se observan productos amplificados de 600 y 800 pb que pertenecen a la secuencia del fragmento de 1.6 kb del ADN genómico de *T. spiralis*. PM de 100 pb. Carril: 1, control positivo LM de *T. spiralis*. Carril: 2, control negativo ADN

de ratón no infectado. Carril: 3, control negativo ADN de caballo no infectado. Carril: 4, control de reactivos. Carril 5-12; muestras de caballos del matadero San Vicente. Carril: 13-17; muestras de caballos del matadero de Río Frío. Todos los animales son originarios del Estado de Veracruz. Gel de agarosa al 2%. 47

Figura 16. Productos de amplificación obtenidos del análisis por PCR y los iniciadores pPRA de 15 muestras de diafragma y 3 sangre de caballos determinadas previamente como positivas para *T. spiralis*. Se incluyeron 2 muestras de ADN de 2 aislados del parásito obtenidos de cerdo. PM de 100 pb. Carril 1, control positivo LM *T. spiralis* de porcino; Carril 2, ADN de ratón no infectado control negativo; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4, control de reactivos; Carril 5-7: músculo de caballos procedentes del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: músculo de caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo originario de San Luís Potosí; Carril 21 y 22 sangre de caballos traídos del Estado de Veracruz; Carril 23 y 24, LM de dos aislados de *T. spiralis* de cerdo 1976 y 2000 respectivamente. En las 20 muestras (carril 5-24) previamente determinadas como positivas se observan los productos de amplificación de 600 y 800 pb, que pertenece a las secuencia del fragmento de 1.6 Kb de *T. spiralis*, así como en el control positivo (carril 1). Gel de agarosa al 2% 48

Figura 17. Producto de amplificación obtenido por PCR múltiplex empleando los iniciadores oTsr 1 y 4 en mezcla (carriles 1 y 2) ó por separado (carriles 3 y 4). El producto amplificado es de 173 pb que corresponde al SE-V del ADNr de la cepa de referencia de *T. spiralis* porcina. La intensidad de los productos amplificados en cada ensayo muestras las diferencias entre ambos de manera cualitativa. La electroforesis se realizó con 5 µL de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%. 49

Figura 18. Análisis de las muestras de ADN de caballo positivos a *T. spiralis* (con la secuencia pPRA) y aislados de *T. spiralis* de cerdo mediante PCR usando los iniciadores oTsr 1y 4 (oligos I en Tabla 3). En todas las

muestras se observa un amplificado de 173 pb, que corresponden al SE-V del ADNr de *T. spiralis*. PM de 100 pb. Carril 1, control positivo de LM de *T. spiralis* porcina; Carril 2, control negativo ADN ratón no infectado; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4 control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo procedente del Estado de San Luís Potosí; Carril 21 y 22: sangre de caballos de Veracruz; Carril 23 y 24 LM de asilados de cerdo 1976 y 2000 de Zacatecas. Gel de agarosa al 2%..... 50

Figura 19. Productos de amplificación del SE-V del ADNr de *T. spirais*. En todas las muestras se observa un fragmento de 290 pb, que no presentan diferencias de peso molecular. Marcadores de peso molecular (PM) 100 pb; Carril 1, control positivo LM *T. spiralis* porcino; Carril 2, control negativo ratón sin infectar; Carril 3, control negativo de caballo; Carril 4, control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo procedente del Estado de San Luís Potosí; Carril 21 y 22, sangre de caballos del Estado de Veracruz; Carril 23 y 24 LM de asilados de cerdo 1976 y 2000 de Zacatecas. Gel de agarosa al 2%. 51

Figura 20. Análisis de SSCP de los amplificados del SE-V del ADNr de *T. spiralis*. PM de 50 y 100 pb; Carril 1, control positivo de LM *T. spiralis*; Carril 2-4, muestras de caballos procedentes del Estado de San Luís Potosí; Carril 5-16, muestras de caballos del Edo de Veracruz; Carril 17, muestra positiva en sangre de caballo del Edo de San Luís; Carril 18 y 19, muestras positivas en sangre del Edo. de Veracruz; Carril 20 y 21 LM de *T. spiralis*, obtenidas de cerdo en 1976 y 2000 respectivamente, ambas procedentes de Zacatecas. En el control positivo se observa un patrón de seis bandas con un peso entre 150 y 450 pb, algunas de éstas no están presentes en todas las muestras, además de la presencia de otras bandas que se encuentran entre los 1200 y 1300 pb. Esto indica que existe una variación

en la secuencia del SE-V de la subunidad mayor de ADNr del parásito.
Gel de poliacrilamida al 7.5%, tinción de plata. 53

Glosario

Agente infeccioso: Son los microorganismos que producen enfermedades en el individuo. La infección consiste en la entrada y desarrollo o multiplicación de un agente infeccioso en el hospedero. Infección no es equivalente a enfermedad, algunas infecciones no producen enfermedad clínica.

Alelo: Formas alternativas de un gen en un mismo locus.

Antigenicidad: Es la acción de un antígeno (molécula) que induce la formación de anticuerpos.

Brote: Se refiere a la aparición de un número poco común de casos de una enfermedad o infección en un tiempo limitado y en una población claramente identificable.

Caso: Individuo identificado con la enfermedad o condición de interés que se definió en una investigación clínica.

Cepa (Raza): Grupo de descendientes que se originan de un ancestro común y conservan las características genéticas básicas y biológicas del mismo grupo. Mientras el parásito no sea estudiado con criterio morfológico, biológico, bioquímico, genético, inmunológico y epidemiológico se considera aislado. El parásito estudiado y caracterizado mediante diversas técnicas se considera entonces una cepa o raza clasificada conforma a normas internacionales especiales para cada parásito.

Epidemiología: Ciencia que estudia la frecuencia, distribución y determinantes de salud y de la enfermedad en las poblaciones.

Especificidad: Es la proporción de individuos realmente sanas que son clasificadas como tales con la prueba de detección.

Gen: Unidad funcional y física de la herencia. Segmentos específicos de ADN incluyendo exones, intrones y secuencias de control de la transcripción necesarias para la producción de RNA o proteínas funcionales.

Helmintos: Gusanos multicelulares con tejidos y órganos.

Hospedero o Huésped: Es el tercer eslabón en la cadena de infección, se define como la persona o animal que proporciona un lugar adecuado para que un agente

infeccioso crezca y se multiplique en condiciones naturales. El punto de entrada en el hospedero varía según los agentes y puede estar en piel, mucosa o los aparatos digestivo y respiratorio.

Homocigoto: Es un individuo en el cual los dos genes para un carácter dado son idénticos.

Heterocigoto: Es un individuo en el cual los dos genes para un carácter dado son diferentes.

Incidencia: Número de casos nuevos de una enfermedad, evento o condición de interés en una población específica y en un periodo determinado.

Infectividad: Es la capacidad del agente para invadir y producir infección en el huésped.

Locus: Es el lugar específico de un gen en un cromosoma

Loci: Plural de locus

Matadero: Establecimiento donde se mata y prepara el ganado para el abasto público.

Meiosis: En eucariontes, un tipo especial de división celular que tiene lugar durante la maduración de las células germinativas (gametos).

Nemátodo: Gusano cilíndrico no segmentado, con cavidad celómica, simetría bilateral y tubo digestivo completo.

Prevalencia: Número de casos existentes de una enfermedad o condición de interés en una población definida y tiempo establecido.

Patogenicidad: Es la capacidad de agente para producir enfermedad, se mide por la relación entre el número de personas que desarrollan la enfermedad clínica y el número de personas expuestas a la infección.

Polimorfismo: La presencia de variación formas (de un rasgo o de un gen en una población; la proporción de loci génicos polimórficos en una población.

Protozoo: Ser unicelular capaz de replicarse en el huésped.

Portador: Es un individuo infectado que no tiene manifestaciones de enfermedad, transmite el organismo silenciosamente, pero no es necesario para que el agente sobreviva. El portador es un **Foco** importante de infección. El **Foco** de infección es el individuo u objeto a partir del cual el agente pasa al hospedero, huésped u

hospedador.

Reservorio: Es el hábitat natural de un agente infeccioso y puede ser el hombre, los animales u otras fuentes ambientales. Es necesario para que el agente sobreviva.

Sensibilidad: Es la proporción de individuos realmente enfermos del conjunto de la población sometida a la detección sistémica, que son clasificados como enfermos mediante la prueba en cuestión.

Zoonosis: Enfermedades infecciosas comunes al hombre y a los animales. Las zoonosis directas pueden perpetuarse en un hospedero.

Virulencia: Propiedad de un agente patógeno infectante de provocar un cuadro morboso en un hospedero determinado. Mide la gravedad de la infección y puede variar desde muy baja hasta muy alta.

Bibliografía consultada para el glosario

- Beaglehole, R., Bonita, R., Kjellström, T. 1994. Epidemiología Básica. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D. C.: OPS. Capítulo 6, Epidemiología y prevención; Capítulo 7, Epidemiología de las enfermedades transmisibles.
- Diccionario Enciclopédico Larousse 2003. México. Ed. Larousse México.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell J. 2002. Biología Celular y Molecular. 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Glosario.

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ssADN: Subunidad pequeña de ADN
lsDNA: Subunidad grande de ADN
ADNr: Ácido desoxirribonucleico
ribosomal
ARN: Ácido ribonucleico
SE: Segmento de expansión
ITS: Espaciador transcrito interno
pb: Pares de bases
Kb: Kilo base
KDa: Kilo Daltons
mL: Mililitros
 μ L: Micro litro
mm: Mili metros
 μ m: Micrómetros
mM: Mili molar
pmol: Pico mol
g: Gramos
mg: Miligramos
ng: Nano gramos
 μ g: Microgramos
U: Unidades enzimáticas
ATP: Trifosfato de adenosina
dNTPs: Desoxinucleotido trifosfato
UV: Ultra violeta
nm: Nano metros
rpm: Revoluciones por minuto
p/v: Peso volumen

v/v: Volumen-volumen
c.b.p: cuanto baste para
seg: Segundos
min: Minutos
h: Hora
PCR: Reacción en Cadena de la
Polimerasa (Polimerase Chain
Reaction)
SNC: Sistema Nervioso Central

Resumen

La Triquinelosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por nemátodos del género *Trichinella*, que afecta a más de 150 especies de animales incluyendo al humano. Se transmite principalmente por el consumo de carne infectada de cerdo cruda o mal cocida; aunque, también el caballo puede transmitir la infección. El mecanismo de transmisión de esta parasitosis al caballo no se conoce. La triquinelosis es una zoonosis emergente o reemergente en varias regiones del mundo y está considerado un problema de salud pública por afectar a 11 millones de personas a nivel mundial. La clasificación taxonómica del parásito es complicada debido a que todas las especies presentan diferencias morfológicas menores, además, la existencia de variabilidad biológica y genética en los aislados de *Trichinella* obtenidos de distintas regiones geográficas y hospederos, dificulta su identificación. Sin embargo, se han identificado a la fecha ocho especies y tres genotipos. En México, sólo se ha reportado la presencia de *T. spiralis*. La presencia de variabilidad genética en aislados de diferentes animales, incluyendo caballos, colectados de diferentes regiones de México ha sido sugerida a partir de estudios en los que se amplificó por PCR una secuencia altamente repetida presente en el genoma de *T. spiralis*, denominada pPRA. Actualmente, secuencias conservadas, como las de los genes ribosomales, se emplean como marcadores genéticos y permiten determinar con mayor exactitud la variabilidad genética en los aislados del parásito. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad genética en la secuencia SE-V del ADN ribosomal de la subunidad grande (lsDNAr) de aislados de *T. spiralis* obtenidos de caballos de distintas regiones de México. Para ello, se obtuvieron 200 muestras de carne de caballo obtenidas de los mataderos San Vicente y Río Frío del Edo. de México, México, a donde llegan caballos de diferentes regiones del país. La presencia del parásito se analizó por el método de digestión artificial y por PCR simple usando los iniciadores pPRA, así como por un ensayo de PCR múltiple, que permite la identificación tanto de la presencia del parásito como de la especie de que se trata. En el estudio se

incluyeron 15 muestras de músculo y 3 de sangre de caballos, previamente determinadas como positivas para *T. spiralis*, además de dos aislados de cerdo. Tanto por el método digestión artificial como por el PCR múltiplex, no se detectó la presencia del parásito en las muestras de caballo colectadas en este estudio. Sin embargo, al analizar el material genético por PCR empleando los iniciadores pPRA se amplificaron los productos esperados de 600 y 800 pb en 22 y 11% de las muestras de los mataderos San Vicente y Río Frío, respectivamente, indicando la presencia de *T. spiralis*. Las muestras positivas incluidas en el trabajo, se confirmaron como positivas. Las muestras positivas por PCR con los oligos pPRA se analizaron con los iniciadores oTsr1 y oTsr4 que amplifican el SE-V del IsDNAr de *T. spiralis*, obteniéndose el producto de amplificación específico de 173 pb. Con otro juego de iniciadores (oTsr 3 y 4) se procedió a amplificar una región más amplia del SE-V del IsADNr del parásito, los productos obtenidos se purificaron y se emplearon para analizar el polimorfismo de la secuencia mediante el ensayo de SSCP no radiactivo. Para el análisis del polimorfismo sólo se consideraron las bandas claramente definidas y consistentes tomando como referencia el control porcino positivo. De esta forma, se observó un perfil de 17 bandas únicas, 14 de éstas fueron polimórficas y 3 monomórficas, con una variabilidad de loci del 82%. El presente trabajo aporta evidencias de la variabilidad genética en la secuencia del SE-V del IsADNr de *T. spiralis*, en poblaciones del parásito presentes en caballos con diferente distribución geográfica. De manera interesante, en este estudio también se observó polimorfismo en la secuencia SE-V de aislados del parásito provenientes de diferente hospedero (cerdo). Con la finalidad de determinar los cambios que se presentan en la secuencia del SE-V de las muestras que mostraron polimorfismo por SSCP, éstas se mandaron secuenciar.

Abstract

Trichinellosis is a parasitic disease caused by the nematode *Trichinella*, its affects more than 150 animal species including man. It's transmitted mainly by the ingestion of raw or bad cooked infected pork meat; although, the horses can also transmit the infection. The mode of transmission of this parasitosis in herbivores and the parasite genetic diversity are under intensive investigation. Trichinellosis is an emergent or re-emergent zoonosis, in several regions of the world and it's considered a public health problem because affects to 11 million people around worldwide. Taxonomic classification of the parasite is complicated because all species of *Trichinella* have little morphological differences, besides the identification of *Trichinella* isolates is difficult because of the biological variability and genetic polymorphism observed in isolates from different geographic origins and host. Up to now, eight species and three genotypes have been identified. In Mexico, only it has been reported the presence of *T. spiralis*. The presence of genetic variability in isolates obtained from different infected animals, including horses, collected from different regions of Mexico has been suggested from studies where a high repeated sequence was amplified by PCR in the genome of *T. spiralis* called pPRA, has shown differences in the products obtained. Nowadays, conserved sequences, like the ribosomal gens (DNAr), are used like genetic markers and allow to determinate whit more precision the genetic variability in the isolates from the parasite. Therefore, the aim of this study was to determine the genetic variability in the SE-V sequence of the IsDNAr of *T. spiralis* isolates obtained from horses of different regions in Mexico. For it, 200 horse meat samples were collected from the slaughterhouses of San Vicente and Río Frío, both in the State of Mexico, Mexico, where there are horses from different regions of Mexico. The presence of the parasite by artificial digestion test and both by a simple PCR using the pPRA oligonucleotides and by a PCR multiplex assay that identifies both domestic and wild *Trichinella* species. In the study were included, 15 muscles samples and three blood's horses as well as pig samples previously determined as positive for *T. spiralis*. By artificial digestion and PCR multiplex assay, was not

detected the presence of the parasite in the horses samples of the study. However, by PCR assay using the primers pPRA, the expected products of 600 and 800 pb were amplified in 22 and 11% of the samples from San Vicente and Río Frío slaughterhouses, respectively, indicating the presence of *T. spiralis* in these samples. The positive samples included in the study were confirmed like positives. When positive samples were analyzed by PCR using a set of primers (oTsr 1 and oTsr 4) that amplify the SE-V of the IsDNAr of *T. spiralis*, the expected amplification product of 173 pb was obtained, confirming they were positive for *T. spiralis*. These positive samples were used to amplify the SE-V of the IsDNAr of *T. spiralis* but now using the oligonucleotides oTsr 3 and 4. The amplification products were purified and their polymorphism was determined by means of the non-radioactive SSCP assay. For the analysis, only consistent defined bands were considered, taking as reference the positive pig sample. A profile of 17 unique bands was observed, of these, 14 bands were polymorphic and 3 monomorphic, with a loci variability of 82%. The present study contributes to the knowledge of the genetic variability in the SE-V sequence of the IsDNAr of *T. spiralis*, in parasite populations present in horses with different geographic distribution. It is worth mention that polymorphism in SE-V sequence was also observed when horses and pig samples were compared. In order to define the changes the account for the polymorphism observed in the SE-V, we are currently sequencing these samples.

Introducción

Muchas enfermedades nuevas, emergentes o reemergentes que afectan al ser humano son causadas por microorganismos patógenos presentes en los animales o en los productos de origen animal. Existe una gran variedad de animales domésticos o salvajes, susceptibles de ser reservorios de patógenos como virus, bacterias o parásitos (Meslin y col., 2000). La incidencia de las parasitosis causadas por protozoos y helmintos es muy alta a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen mil millones de personas, es decir, una sexta parte de la población mundial afectada por una o más de esas enfermedades (OMS: Ginebra, 2007), que han sido responsables de cuantiosas pérdidas de vidas humanas a lo largo de la historia, y su impacto en la salud humana actual sigue siendo considerable, a pesar de que en los últimos veinte años se han realizado esfuerzos para controlar la prevalencia de las enfermedades parasitarias con medidas tradicionales, como campañas higiénicas, sanitarias y tratamientos masivos (UNAM, 2002; OMS: Ginebra, 2007). Dada la amplia distribución de las especies animales que pueden ser afectadas por parásitos, la aplicación de medidas eficaces de vigilancia, prevención y control de las enfermedades zoonóticas plantea grandes dificultades, ya que la interacción del agente-hospedero-ambiente son los que determinan el proceso de salud-enfermedad.

Los grandes brotes de estas enfermedades no son infrecuentes, considerando sobre todo que al principio no suele reconocerse la naturaleza zoonótica de la enfermedad y que ésta pueda propagarse de forma inadvertida durante cierto tiempo (Meslin y col., 2000). Una de las zoonosis de interés para los sistemas de salud pública, emergente y/o reemergente en varias regiones del mundo es la Triquinelosis, causada por nematodos del género *Trichinella*. Este género tiene una amplia distribución geográfica y diversos hospederos, y a menudo los aislados pueden presentar distintas características biológicas. Por lo que el análisis de la

diversidad genética de *Trichinella* es el punto central para entender los patrones de transmisión, la relación huésped-parásito, las formas clínicas o estado natural de la enfermedad y la construcción de la cadena epidemiológica, con implicaciones importantes para el desarrollo de estrategias de control.

Definición

La Triquinelosis es una enfermedad parasitaria, ocasionada por nematodos del género *Trichinella* (Cordero del Campillo y col., 1999). Es considerada una zoonosis directa de distribución mundial, es decir, que es cosmopolita afectando a más de 150 especies de animales carnívoros, omnívoros y herbívoros, incluyendo al humano y se adquiere por el consumo de carne cruda o mal cocida de animales infectados (Dupouy-Camet, 2000).

Agente etiológico

El género *Trichinella*, está formado por ocho especies reconocidas ubicadas a nivel de especies, mientras que otras tres denominadas *Trichinella* T6, T8 y T9, están en un nivel taxonómico incierto (Tabla 1) (Murrell y col., 2000; Kapel, 2000; Pozio y col., 2002).

Tabla 1. Especie y genotipos de *Trichinella* identificados. Distribución y animales que afectan.

Especies	Formación de célula nodriza en músculo	Distribución	Hospedero
<i>T. spiralis</i>	Si	Regiones templadas y tropicales, cosmopolita	Carnívoros silvestres, omnívoros cerdo, rata, caballo
<i>T. nativa</i>	Si	Región nórdica, Norte América, Norte de Europa y Asia	Carnívoros silvestres
<i>T. britovi</i>	Si	Zonas templadas de Asia y Europa	Carnívoros silvestres, cerdo, rata, caballo
<i>T. Nelson</i>	Si	Zona ecuatorial de África	Carnívoros
<i>T. murrelli</i>	Si	Norte América	Carnívoros silvestres, caballo
<i>T. pseudospiralis</i>	No	Europa, Australia, Norte América y Asia	Mamíferos y aves
<i>T. papuae</i>	No	Nueva Guinea	Cerdos
<i>T. zimbabwensis</i>	No	África	Reptiles, mamíferos
Genotipos			
T6	Si	Sur de Canadá, Norte América	Carnívoros
T8	Si	África subtropical	Carnívoros
T9	Si	Japón	Carnívoros

Taxonomía

Trichinella pertenece al grupo de los nematodos intestinales de importancia médica, su estadio adulto habita en el aparato digestivo del hospedero, ya sea humano o animal y sus estadios larvarios se localizan en otras partes del cuerpo, principalmente en músculo esquelético. Su clasificación taxonómica según Owen, (1835) es:

Reino:	Animalia
Phyllum:	Nematoda
Subclase:	Adenophorea (Aphasmidea)
Orden:	Enoplida
Superfamilia:	Trichuroidea
Familia:	<i>Trichinellidae</i>
Género:	<i>Trichinella</i>

Morfología

Existen diferencias significativas en términos de las características morfológicas documentadas en cada una de las especies del género *Trichinella* como largo y ancho del cuerpo del parásito, largo del esófago y del esticosoma, distancia entre la vulva y el extremo anterior, largo del útero, del ovario, del testículo (en el caso del macho), largo y ancho de los apéndices copuladores, distancia del primordio genital, largo del recto; aunque, las diferencias de mayor interés son la capacidad de reproducirse y su capacidad antigénica (Pozio y col., 2002). Por lo que, la descripción morfológica se extiende a todo el género *Trichinella*. El cuerpo del parásito es de forma cilíndrica con la extremidad anterior más delgada que la posterior; presenta tres estadios, adulto (hembra y macho), larva recién nacida (LRN) y larva muscular o larva infectante (LM) (Despommier y col., 1994).

Los adultos son gusanos pequeños y delgados de color blanco cremoso, el macho mide 1.5 mm de largo por 0.05 mm de ancho, sus extremidades anterior y posterior son muy delgadas (Figura 1). Se le identifican el cuerpo cuticular o cutícula abierta, abertura oral, anillo nervioso, esticosomas, intestino medio, intestino posterior y cloaca en la última porción, vesículas seminales, además de dos pares de papilas genitales, tiene solo un testículo que produce espermatozoides no flagelados con 2 a 3 cromosomas. Las células somáticas presentan 5 cromosomas (Ribicich y col., 2005; 2005; De la Rosa y Gómez, 2004).

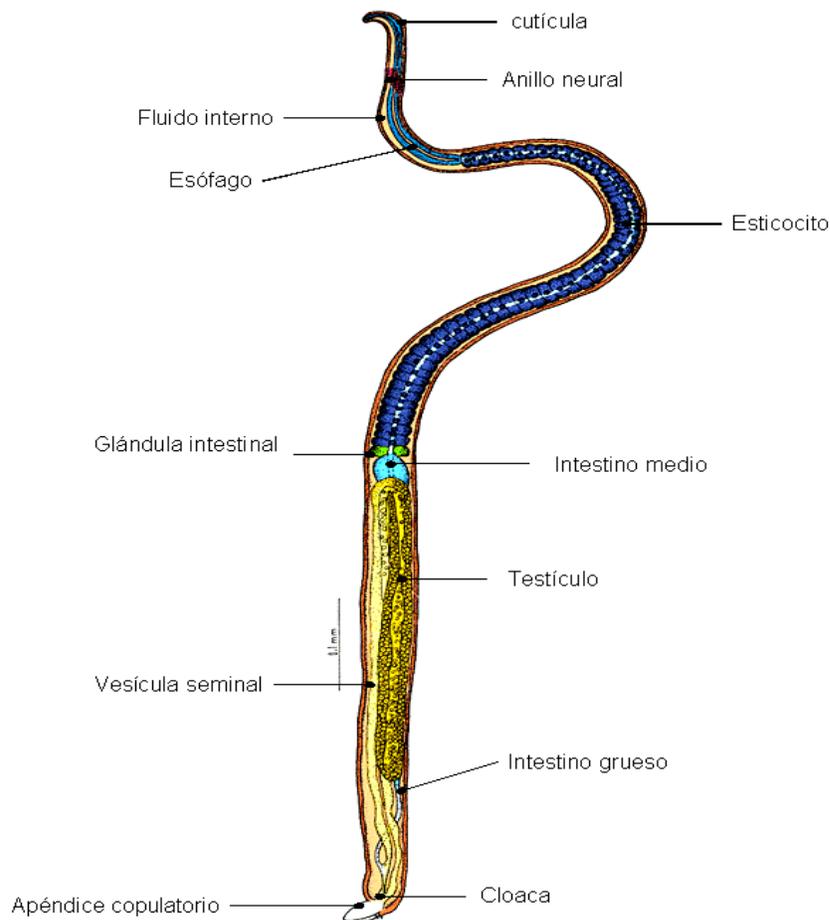


Figura 1. Adulto macho de *T. spiralis*. Tomado de: <http://www.trichinella.org>

La hembra mide aproximadamente 3.5 mm de largo por 0.06 mm de ancho. El extremo anterior termina en punta y el posterior es redondeado (Figura 2). La vulva se abre en la parte anterior del cuerpo cerca del punto medio del esticosoma, en la porción ventral; la vagina se extiende en la parte posterior hasta el útero, que contiene en su porción anterior larvas y huevos; en la región posterior, detrás del útero y cerca de la abertura anal, se encuentra el ovario que produce óvulos con 3 cromosomas. Las células somáticas de la hembra presentan 6 cromosomas (De Haro y col., 1995; Lamonthé y García, 1998; Despommier y col., 2005; De la Rosa y Gómez, 2004).

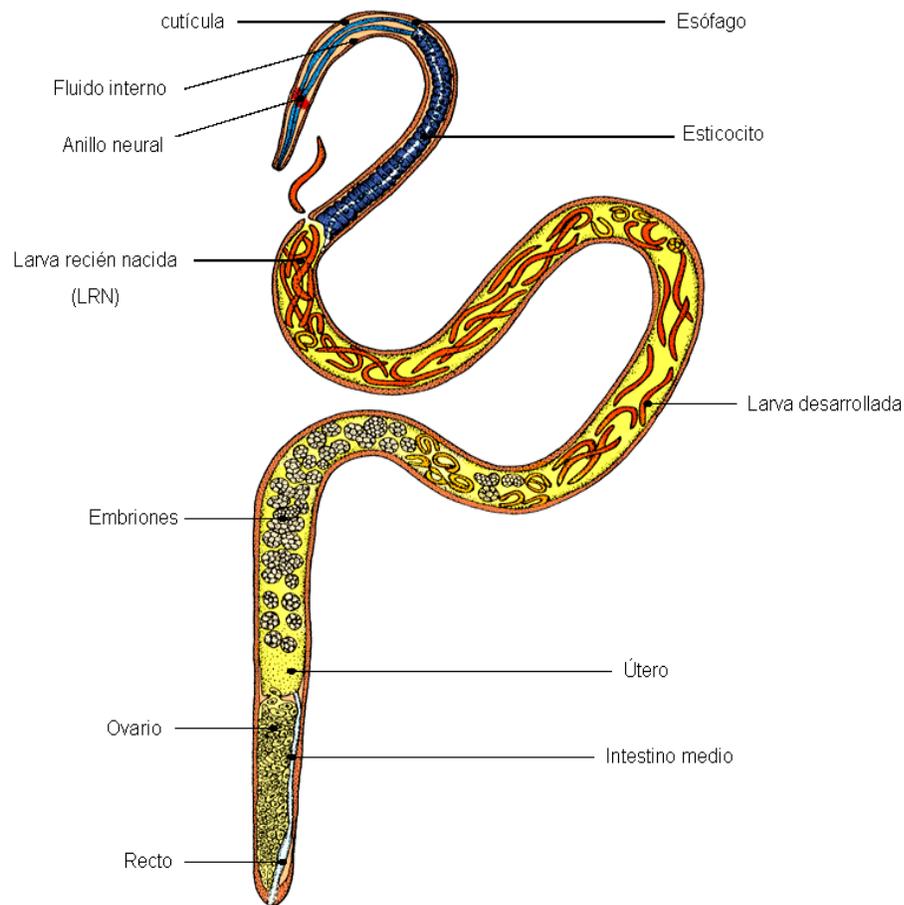


Figura 2. Adulto hembra de *T. spiralis*. Tomado de: <http://www.trichinella.org>

La hembra libera LRN que miden entre 80 y 120 μm de largo por 5.6 μm de ancho, presentan un conjunto de células germinales, pero no órganos. Las LRN son la fase de invasión al músculo, se piensa que éstas poseen un estilete en la parte anterior del esófago con el cual puede penetrar a las células musculares, ya que el sitio de penetración muestra rasgos de desorganización como si se tratara de un proceso mecánico (Lloyd, 2000; De la Rosa y Gómez, 2004). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la penetración de las LRN se realice por medio de procesos enzimáticos.

Las LM son la fase infectiva y al parecer éstas no presentan color (hialinas). En el caso de las especies que desarrollan célula nodriza, las LM que se encuentran enrolladas dentro de ésta miden 90 μm , y se pueden alojar de una a cuatro larvas. La célula nodriza mide entre 300 y 400 μm de largo por 150 a 200 μm de ancho (Figura 3), en el interior de ésta, el parásito realiza movimientos lentos anteroposteriores y su extremidad anterior oscila constantemente como explorando el microambiente que lo rodea (Ribicich, 2005; Despommier y col., 2005).

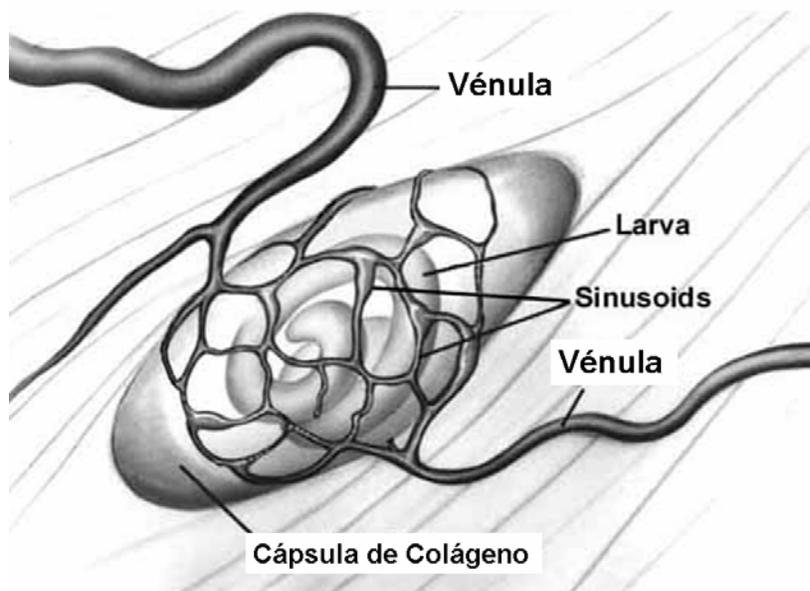


Figura 3. Esquema de la célula nodriza en tejido muscular. Tomado de http://www.trichinella.org/bio_nursecell.htm

Anatómicamente las LM presentan cutícula, anillo neural, intestino, primordio genital y esófago, que esta rodeado por una estructura glandular en su extremo posterior, llamada esticosoma (Figura 4). El esticosoma está formado por un cordón compacto de células dispuestas linealmente llamadas esticocitos (45 a 55 esticocitos), que liberan los componentes de excreción/secreción del parásito, involucrados en la formación de la célula nodriza (Ribicich y col., 2005; 2005). Los esticocitos son células discoides que tienen 5 tipos de gránulos citoplásmicos y presentan al menos 5 subtipos de gránulos que se diferencian en forma y tamaño,

tipo de inclusión, antigenicidad y localización dentro del esticosoma, estos gránulos son; α_0 , α_1 , α_2 , β y γ (De la Rosa y Gómez, 2004). Los alfa esticocitos secretan polipéptidos mayores de 50 a 55 kDa y los beta un polipéptido de 48 kDa, estas moléculas son altamente inmunogénicas, reconocidas por una gran variedad de hospederos (De la Rosa y Gómez, 2004).

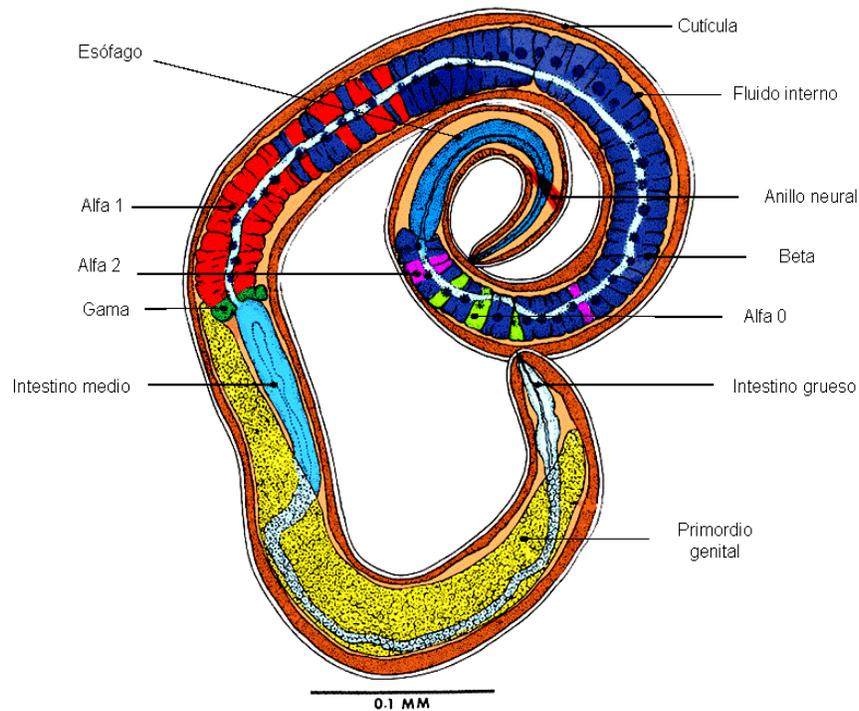


Figura 4. Larva Muscular de *T. spiralis*, fase infectiva. Tomado de: <http://www.trichinella.org>

Ciclo de vida

El hospedero definitivo adquiere la infección al comer carne cruda o mal cocida contaminada con LM viables. Se estima que la ingesta de 70 larvas viables produce la enfermedad clínica humana (Martínez-Pantaleón y col., 1986). En el caso de las especies de *Trichinella*, cuyas LM se encuentran contenidas en la célula nodriza, al ser ingeridas las LM son liberadas de ésta por acción de los jugos digestivos, migrando hacia el intestino delgado proximal (yeyuno), donde se adhieren a la mucosa de las vellosidades y comienzan a desarrollarse. En aproximadamente 24 horas post infección (p. i.) las larvas alcanzan la madurez sexual (adultos) y copulan dentro de los pliegues de la mucosa entre los 2 o 3 días p. i. El macho es expulsado poco después de la cópula y la hembra permanece en el intestino hasta por cinco semanas. Las hembras, enclavadas en la mucosa, liberan LRN, muchas de las cuales se depositan en forma directa en los vasos quilíferos y linfáticos, para ser transportadas por el torrente sanguíneo hasta alcanzar el conducto torácico, llegan a la vena cava, corazón, pulmón y regresan al corazón en aproximadamente 3 a 5 días p. i. Se distribuyen en todo el organismo a través de la circulación sistémica, solamente invaden la musculatura estriada donde se transforma a LM e induce la formación de la célula nodriza alrededor de la quinta semana (Figura 5) (Quiroz, 1999).

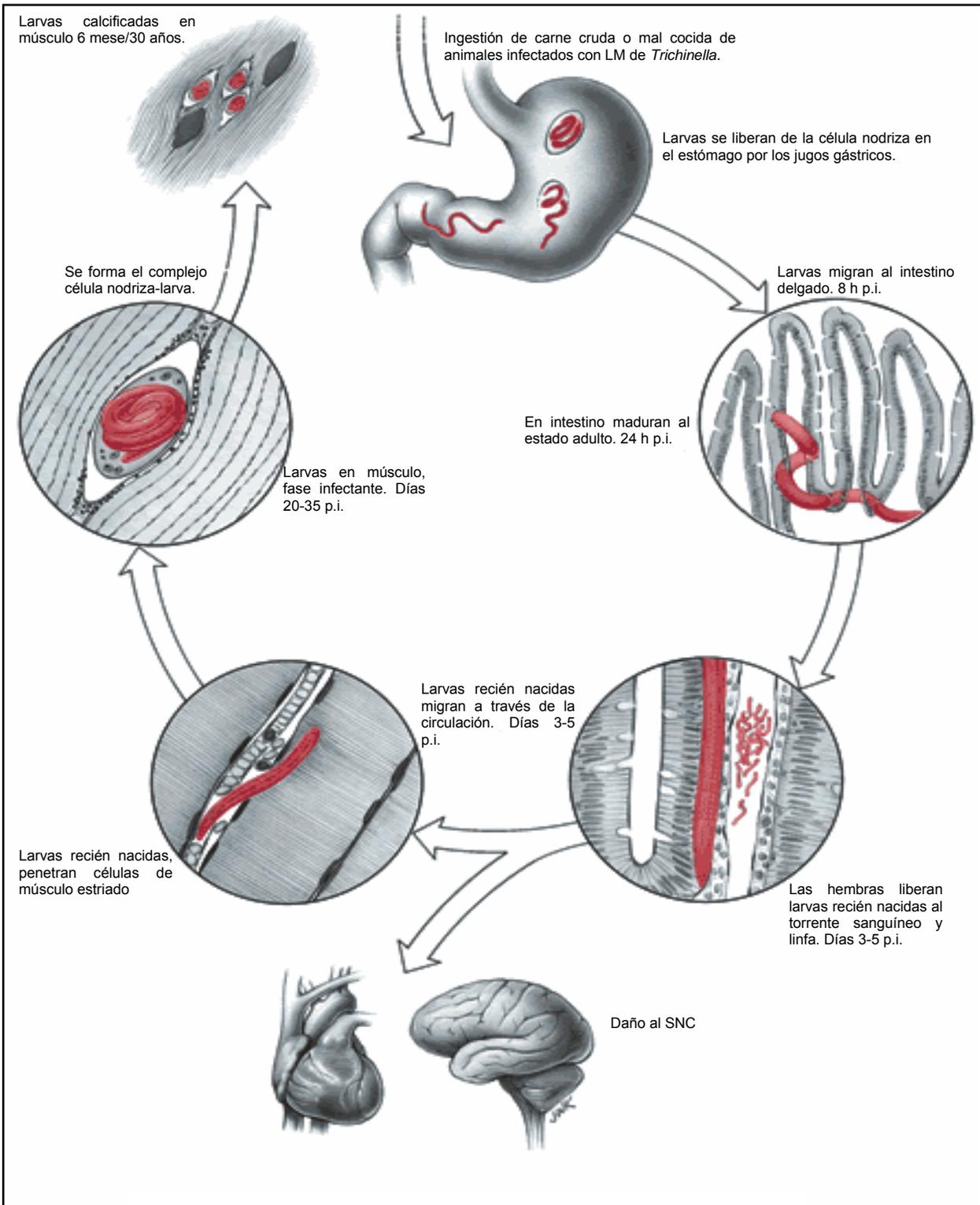


Figura 5. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Tomado de: Despommier y col., 2005. Parasitic Diseases. 5th Ed. Apple Tress Producciones, LLC. New York.

Epidemiología

El género *Trichinella* es responsable de numerosos brotes de triquinelosis humana en varias partes del mundo y es considerada un problema de salud pública por ser una zoonosis, y es competencia de atención de los servicios de salud de una nación o país, además las ciencias en salud pública deben estudiarla en el enfoque multidisciplinario desde el proceso diagnóstico y vigilancia epidemiológica, así como evitar nuevos eventos epidémicos en las poblaciones humanas. Las evidencias indican que afecta a 11 millones de personas en el mundo, principalmente por el consumo de carne de cerdo infectada con el parásito (Dupouy-Camet, 2000; Gajadhar y Gamble, 2000). Se han registrado brotes humanos en Europa, Asia, África y América (Ortega-Pierres y col., 2000; William y col., 2001), ocasionados por nuevas fuentes de infección de *Trichinella* como: carne de caballo, rata, perro y gato; por el consumo de carne de animales de caza deportiva infectados como: jabalís, zorros, ciervos y osos, permitiendo la coexistencia del ciclo de vida silvestre y doméstico del parásito (Dupouy-Camet, 2000; Garate y col., 1991) (Figura 6).

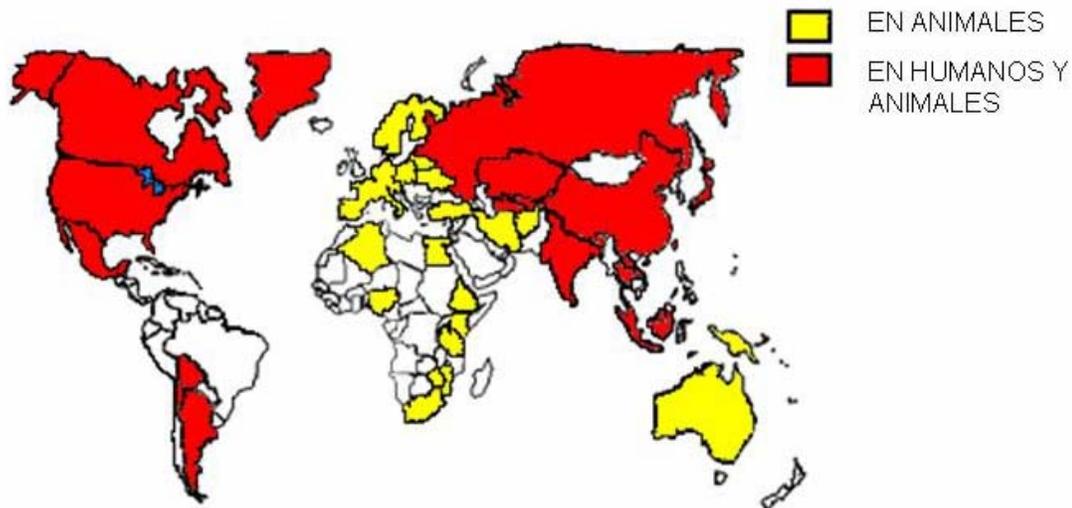


Figura 6. Regiones donde se han reportado casos de *Trichinella* en humanos y animales (Medline, 1965-1999, en Dupouy-Camet, 2000).

La OMS y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en la división de sanidad animal, estipulan que la triquinelosis es una enfermedad de declaración obligatoria de la lista B, considerada como una de las enfermedades transmisibles importantes desde el punto de vista socioeconómico y/o sanitario a nivel nacional y cuyas repercusiones son considerables en el comercio internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2006). En humanos resulta difícil evaluar la prevalencia mundial de esta parasitosis, debido a que las larvas se alojan en los músculos, requiriéndose para el diagnóstico una biopsia que es un procedimiento difícil de practicar en la población en general. No obstante, pueden realizarse exámenes serológicos, aunque éstos presentan algunas desventajas como: difusión de anticuerpos, los títulos disminuyen rápidamente aún cuando los pacientes alojan al parásito y la presencia de reacciones cruzadas con otros nematodos (Dupouy-Camet, 2000).

La Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT, International Commission on Trichinellosis), en el periodo de 1995 a 1997, informó de más de 10,000 casos humanos y 18 decesos en todo el mundo (Dupouy-Camet, 2000), la mayoría de los casos están relacionados con el consumo de carne de cerdo y sus derivados infectados con el parásito. En 1998, la OIE reportó más de 10,000 porcinos infectados. El cerdo adquiere la infección por comer carne de otros animales infectados que se encuentran en los criaderos, cuando son mantenidos en malas condiciones higiénicas o son criados de forma extensiva en praderas. De manera importante, estos animales pueden también ingerir carne de ratas infectadas con el parásito. Las ratas son uno de los principales hospederos del parásito y se infectan por sus hábitos de canibalismo, por lo que se mantiene y propaga la infección en la naturaleza (Lloyd, 2000; Maroli y Pozio, 2000). Otros animales que mantienen la infección son los perros y gatos, que han causado brotes humanos de triquinelosis en Asia, donde se consume su carne comúnmente (Takahashi y col., 2000).

En países como Italia y Francia, la carne de caballo sigue siendo la principal fuente de infección de *Trichinella* en humanos, ya que de 1975 a 1998, se reportaron 3,300 casos en trece brotes (Ancelle, 1998; Pozio y col., 1999), por lo que el Consejo de la Comunidad Europea (Consejo Directivo 94/59EEC) exigió que toda la carne de caballo que se produce y comercializa en el mercado local o de importación se analice por digestión artificial, con un mínimo de 10 g de los músculos maseteros, lengua o diafragma. En áreas donde se consumen grandes cantidades de esta carne se deben analizar más de 100 g de tejido (Gamble y col., 2000; Pozio y col., 2001). El modo por el cual los caballos adquieren la infección no es claro y más aún cuando estos animales son herbívoros. No obstante, se han propuesto algunas teorías sobre las vías de infección en caballos: (1) por la ingestión de insectos, que pueden ser huéspedes paraténicos; (2) por alimentarse en praderas contaminadas con heces de cerdos y animales salvajes que ingirieron carne infectada de otros animales (1 a 2 días previamente); (3) por alimentarse con pasturas contaminadas con restos de carne de roedores, cerdos y de otros animales carnívoros silvestres infectados con *Trichinella* (Pozio y col., 1997; Ancelle y col., 1998; Pozio y col., 2001; Touratier, 2001).

De manera experimental se ha logrado reproducir la infección en caballos, demostrando que son susceptibles a la infección con distintas especies del género *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni* y *T5*); de las cuales *T. spiralis* fue la más infectiva. Se han utilizado 5, 10, 20, 50 y 70 mil LM para reproducir la infección, y cabe mencionar que durante la infección no se observaron signos clínicos aparentes (Arriaga-Díaz y col., 1996; Pozio y col., 1997; Pozio y col., 1999). En infecciones naturales, es probable que la triquinelosis pueda seguir otro curso debido a que los animales generalmente están bajo condiciones de estrés, factor que contribuye a la inmunodepresión, favoreciendo el establecimiento de un mayor número de larvas en los músculos con respecto a las infecciones experimentales.

En América, los países donde se presenta con mayor frecuencia esta enfermedad son Argentina, México, Uruguay, Chile y Bolivia. Cabe mencionar que en estos países, únicamente se ha informado de la presencia de *T. spiralis*. Aunque existen estadísticas oficiales de la situación zoonositaria mundial de la triquinosis en la OIE (2006), las referentes a México sólo indican la presencia de la enfermedad y no el número de casos. A pesar de ello, en algunas zonas rurales de México se estima una prevalencia de anticuerpos en mujeres del 2.36% y en hombres del 0.35% (Monrroy y col., 2000). Las cifras en caballos y cerdos son de 5% y 12% respectivamente (Arriaga-Díaz y col., 1996). Esto indica que existe un subregistro en el reporte de la enfermedad. En cuanto a los brotes ocurridos en México, sólo algunos de éstos se han documentado, como los casos humanos ocurridos por el consumo de carne de cerdo infectada mal cocida en los Estados de Zacatecas, Michoacán, Edo. de México, Durango, Jalisco, Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Colima, San Luis Potosí, Hidalgo, Chihuahua, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz, Sonora y el Distrito Federal (Ortega-Pierres y col., 2000).

En el periodo de 1970 a 1990, se registraron ocho casos de triquinosis en niños, según el Instituto Nacional de Pediatría (INP) de la Secretaría de Salud en la Ciudad de México y en 1992 se reportaron 4 casos en el Hospital Infantil de México, Federico Gómez, además de 65 casos ocurridos en una oficina de gobierno en el Distrito Federal (Álvarez-Chacón y col., 1992; Ortega-Pierres y col., 2000). Debido a esto, la Dirección General de Epidemiología (DGE) comenzó a reportar los casos al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAPE) y en el periodo del 2001 al 2002, se declararon 26 casos (total) en los Estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Hidalgo, Jalisco, Sinaloa, Sonora y Tabasco (SINAPE, 2003). Existen otras áreas endémicas que no reportan de manera oficial los casos de triquinosis humana, por lo que es importante llevar a cabo estudios epidemiológicos que determinen la situación de la enfermedad con el fin de establecer medidas de control en la transmisión de esta parasitosis. La investigación epidemiológica

constituye el propósito fundamental para que un episodio nosológico no se vuelva a repetir en la población.

En América Latina y particularmente en México, la carne de caballo es usada como alimento para animales domésticos. Sin embargo, se sabe que se utiliza para la elaboración de diferentes embutidos como: chorizo, longaniza, jamón y también carne para hamburguesas (Almaraz y col., 1995). De tal manera, que el consumo de este tipo de carne se ha incrementado en los últimos años, principalmente en el abasto popular de bajo poder adquisitivo debido a su bajo costo (Almaraz y col., 1995; Arriaga-Díaz y col., 1996; Ortega-Pierres y col., 2000). Se sabe que la mayor parte de esta carne proviene de mataderos privados que no cuentan con la infraestructura necesaria para realizar una inspección sanitaria detallada, ni con las técnicas apropiadas para detectar la presencia de *Trichinella*, a excepción de los mataderos denominados Tipo Inspección Federal (TIF) que sacrifican y exportan carne de caballo a Japón, Alemania y Francia (Yépez-Mulia y Ortega-Pierres, 1994; Arriaga-Díaz y col., 1996).

En México, la carne de caballo no se considera como fuente de transmisión de la *Trichinella* al hombre. Sin embargo, Yépez-Mulia y Ortega-Pierres (1994) refieren por primera vez la triquinelosis equina y la necesidad de contar con herramientas de diagnóstico en los mataderos que identifiquen caballos infectados, debido a que en Francia, en 1994, se presentaron siete casos de triquinelosis humana que fueron ocasionados por el consumo de carne de caballos procedentes de México. Es probable que algunos de estos equinos presentaran cargas parasitarias bajas, que no pudieron ser detectadas por los métodos de diagnóstico utilizados en los mataderos (Dupouy-Camet y col., 1994).

Es importante mencionar que en el Estado de México existen dos mataderos que sacrifican más de 38,000 caballos anualmente, sólo para el abasto del D. F., y en estudios realizados en un de estos, se identificó la presencia de *T. spiralis* (5-

14%) en muestras de tejido muscular analizadas mediante la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction), (Arriaga y col., 1995; Viveros y col., 2001; Uribe y col., 2003). Aproximadamente, el 50% de esta carne se destina para el consumo humano, lo que representa un riesgo potencial de infección para la población humana que consume este tipo de carne (Arriaga y col., 1995; Uribe y col., 2003). Además, en muestras de diafragma de equinos de un rastro TIF, analizadas también por PCR, se amplificó ADN del parásito en el 2% de la población estudiada (Viveros y col., 2001). Lo anterior indica que la infección en caballos es frecuente y similar a lo reportado en algunos países europeos, que es de 4 a 22% (Pozio y col., 1997; Ancelle y col., 1998; Pozio y col., 1999; Murrell y Pozio, 2000; Sofronic y col., 2000; Pozio, 2001).

El ADN ribosomal (ADNr) como marcador filogenético y de clasificación

El *Phylum* Nemátoda está representado por más de 26 000 especies, la mayoría de ellas son agentes patógenos de importancia en veterinaria, medicina y agricultura. No obstante, a menudo es difícil distinguir entre las especies de nematodos debido a la falta de características morfológicas diferenciales para el diagnóstico, por lo que esta similitud no permite realizar estudios de evolución. En consecuencia, se han desarrollado marcadores genéticos a partir del genoma mitocondrial y ribosomal de los nematodos, usados para identificaciones especie-específicas (Chilton y col., 2003).

En la naturaleza, una de las secuencias más conservadas del ADN es la ribosomal, que se ha utilizado para realizar estudios de filogenética y evolución. En la clasificación de organismos se han empleado la subunidad mayor del ADNr (lsADNr) y la subunidad menor del ADNr (ssADNr) (Zarlenga y col., 1996). En los eucariontes, la lsADNr comprende los genes 5.8S y 26/28S del ARNr, que contienen secuencias centrales relativamente conservadas consideradas esenciales para el funcionamiento del ribosoma. Dentro de la molécula de lsADNr existen 12 regiones altamente variables, conocidas como **dominios divergentes (D)** o **segmentos de expansión**

(SE). Al parecer, SE no altera la función del gen ribosomal, por lo que el polimorfismo se ha mantenido dentro del ADNr. Aunque existe una variación significativa en la secuencia y tamaño de los SE entre eucariontes altamente divergentes, la estructura secundaria de algunos dominios se mantiene relativamente conservada, por lo que, la variabilidad en las secuencias de los SE los hace útiles para realizar análisis de evolución en los organismos que divergen a lo largo del tiempo (Zarlenga y col., 1991; Zarlenga y Dame, 1992; Zarlenga y col., 1996; Chilton y col., 2003).

Otras secuencias del ADNr que se han utilizado como marcadores genéticos para analizar diferencias genéticas entre aislados de *Trichinella*, son los espaciadores internos transcritos (ITS), que son una familia de genes muy conservados (Kwon y col., 2001). El dominio SE-III del lsADNr también se ha utilizado como marcador molecular para analizar las diferencia genéticas en otros parásitos nemátodos (Chilton y col., 2003).

Klassen y colaboradores (1986) sugirieron que se puede seguir el curso evolutivo de las cepas de *T. spiralis* analizando las secuencias repetidas del genoma, que pueden ser identificadas y clonadas. Estas y algunas secuencias intergénicas, como las del SE e ITS generalmente presentan mutaciones y es probable que estas regiones o secuencias presenten variabilidad a nivel de especies o subespecies (Zarlenga y Dame, 1992).

Antecedentes

El género *Trichinella* está formado por ocho especies y tres genotipos (Tabla 2), aunque no se tiene una clasificación completa todavía. La clasificación taxonómica ha sido complicada, ya que las características morfológicas analizadas por microscopía electrónica, son menores en cada una de las especies analizadas (Yao y col., 1997).

Tabla 2. Especies y genotipos de *Trichinella*.

Especies	Genotipos
<i>T. spiralis</i>	T6
<i>T. nativa</i>	T8
<i>T. britovi</i>	T9
<i>T. nelsoni</i>	
<i>T. murrelli</i>	
<i>T. pseudospiralis</i>	
<i>T. papuae</i>	
<i>T. zimbabwensis</i>	

Los principales criterios utilizados en la clasificación de *Trichinella* son biológicos y bioquímicos, como el índice de capacidad reproductiva (ICR), la resistencia de la larva muscular a bajas temperaturas, la patogenicidad, la antigenicidad, la virulencia en el hospedero, el tipo de hospedero que infectan, el origen geográfico del parásito, la distribución intestinal de larvas adultas, la producción de LRN *in vitro* (Pozio y col., 1992), los ensayos de hibridación cruzada y los análisis de polimorfismo con enzimas de restricción del ADN (Garate y col., 1991). A través de estos estudios, se ha demostrado que el género *Trichinella* es un grupo de nemátodos genéticamente heterogéneo, con extrema variación en sus características biológicas, esto es interpretado como el reflejo de la diferenciación a nivel de especie, inclusive, se ha postulado que este proceso evolutivo se presenta a nivel de subespecie, variedad o cepa (Pozio y col., 1992).

La variabilidad biológica entre aislados de *Trichinella* silvestre y doméstica está documentada en estudios taxonómicos realizados por Yao y colaboradores (1997). Murrell y colaboradores (2000), refieren que existen cepas de *T. spiralis* muy infectivas en ratas y cerdos domésticos, mientras que cepas obtenidas de animales silvestres presentaron menor capacidad infectiva en hospederos domésticos; además, observaron diferencias en cepas obtenidas de zonas geográficas diferentes. Los experimentos de infección comparativa, realizados con cepas silvestres en perros y cerdos domésticos de África, presentan resultados similares (Murrell y col., 2000).

Dea-Ayuela y Bolas-Fernández (1999) reportaron que existe una correlación entre el origen geográfico y la variación de los antígenos de superficie de *T. spiralis* y *T. nativa* que puede influir en la infectividad. También se observaron diferencias marcadas de infectividad entre *T. spiralis* y T5, relacionada con la variación en las secuencias de ADN que codifican para los antígenos de 46-49/43 ó 53 kDa de ambas especies.

Bolas-Fernández (2003), determinó la infectividad y la antigenicidad de cuatro aislados de *T. spiralis* (de Inglaterra, 1939; España, 1963; Hong Kong, 1981 y Nueva Zelanda, 1968), uno de *T. nativa* (de Norte América, 1948) y uno de *T. pseudospiralis* (de Polonia, 1972) en ratones. El proceso de infección se evaluó en términos del ICR, que considera el número de hembras establecidas, la fecundidad, tiempo de reproducción y supervivencia de larvas musculares. En este estudio se observaron diferencias consistentes entre los aislados *T. spiralis* de España y Hong Kong que presentan los valores más altos en el ICR. En este orden le siguen los aislados de Inglaterra y Nueva Zelanda, con valores intermedios entre éstos dos se encuentra *T. pseudospiralis*. El menor valor en el ICR fue para *T. nativa*.

El análisis de los componentes de superficie de las larvas de estos aislados, marcados con ^{125}I y por extracción con detergente Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), se realizó mediante Western-blot con anticuerpos policlonales derivados de

sueros de animales infectados y/o anticuerpos monoclonales dirigidos contra *T. spiralis* de Inglaterra, mostró diferencias cuantitativas y cualitativas entre los aislados de *T. spiralis* de Nueva Zelanda, *T. nativa* de Norte América y *T. pseudospiralis* de Polonia; Principalmente, por la ausencia de una banda de 64 kDa en *T. nativa* y *T. spiralis*. Otra diferencia importante es el reconocimiento de una banda de 34 kDa por los anticuerpos monoclonales, presente sólo en el aislado *T. pseudospiralis* de Polonia y la detección de una banda prominente de 40 kDa en el aislado *T. nativa* de Norte América (Bolas-Fernández, 2003).

Esta variabilidad biológica entre aislados de *Trichinella* y la infectividad en hospederos de laboratorio, es una expresión de la variación inmunogénica. Bolas-Fernández y Wakelin (1992), analizaron los antígenos de superficie de seis aislados de *T. spiralis* (el orden indica el código y ciudad de origen respectivamente: U. K., Londres; GM-1, España; Lasio, España; C-76, España; Mad-83, España; Sevilla, España), obtenidos de diferentes hospederos y diferentes años. El aislado de U. K., presentó tres bandas de proteínas antigénicas entre los 43-50 kDa, una banda superior de 67 kDa y una menor de aproximadamente 62 kDa. Mientras que el resto de los aislados sólo presentaron las bandas de 43-50 kDa, y sólo Mad-83 presentó la banda de 67 kDa. El aislado C-76 mostró un patrón antigénico diferente, con dobletes en 50 y 43 kDa, y una banda adicional de 20 kDa. Estos resultados muestran la existencia de variabilidad antigénica entre aislados de *T. spiralis*; además, pueden presentar variabilidad considerable en su infectividad y en su habilidad para establecerse en los hospederos (Bolas-Fernández y Wakelin, 1992).

La identificación y clasificación de las especies de *Trichinella spp*, se ha venido estableciendo con la aplicación de las herramientas de la Biología Molecular y en particular, con la tecnología de PCR, que permiten determinar las diferencias entre especies del parásito mediante el análisis de las secuencias del genoma (William y col., 2001).

La caracterización de *Trichinella* y de manera especial de *T. spiralis*, ha sido ampliamente realizada mediante el estudio de secuencias repetidas del genoma del parásito (Zarlenga y col., 1991). Klassen y colaboradores (1986), determinaron que el $42\pm 8\%$ del ADN genómico de *T. spiralis*, está formado por secuencias repetidas, definido por un análisis de restricción sobre el ADN total del parásito con la endonucleasa *Eco R1*. El perfil de restricción mostró un fragmento prominente de 1.7 Kb, que fue clonado y secuenciado por de Vos y colaboradores (1988), y que ha sido utilizado como marcador molecular específico para *T. spiralis* (Klassen y col., 1986; de Vos y col., 1988). El fragmento de 1.7 Kb está formado por secuencia repetidas organizadas en tandem, presenta dos fragmentos con marcos de lectura abiertos, pero no se tiene evidencia de transcripción (de Vos y col., 1988; Dupouy-Camet y col., 1991; Dick y col., 1992) (Figura 7). A partir de una secuencia de 1.6 Kb derivada del fragmento de 1.7 Kb se sintetizaron los oligonucleótidos pPRA que amplifican dos fragmentos de 600 y 800pb y en algunos casos un fragmento de 1,200 pb (Dupouy-Camet y col., 1991; Dick y col., 1992; Soulé y col., 1993; Viveros y col., 2001; Caballero y Jiménez, 2001; Uribe y col., 2003; Trejo y col., 2004).

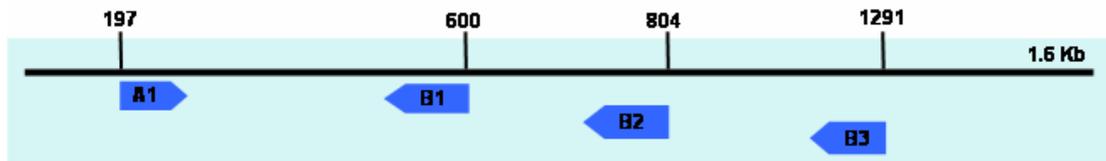


Figura 7. Diagrama del fragmento de ADN repetitivo de 1.6 Kb, de *T. spiralis* indicando las regiones de alineamiento de los iniciadores pPRA en el PCR. A1 [⁵GTAAGCGGTGGTGCATTCAT³] y B1 [⁵AGTTTGCATACCGAACACCGCTC³]. B2 y B3 indican que el oligo B1 tiene sitios de unión con secuencias homologas de 76 y 57% respectivamente. Los números (pares de bases) indican la posición del iniciador en el extremo 5' de la secuencia pPRA, las flechas indican la región y dirección de la secuencia complementarias en donde los iniciadores se unen. Adaptado de Dick y col., 1992.

Dick y colaboradores (1992) emplearon la técnica de PCR y los iniciadores pPRA con el ADN de 13 aislados de *T. spiralis*, observando que las muestras presentaban amplificaciones de 600, 800 y 1,200 pb, dependiendo de su origen

geográfico y del tipo de hospedero del que los parásitos se obtuvieron. Estos hallazgos sugieren que las secuencias del fragmento de 1.6 Kb presentan cierta heterogeneidad entre aislados de *T. spiralis* de hospederos silvestres y domésticos (Figura 8).

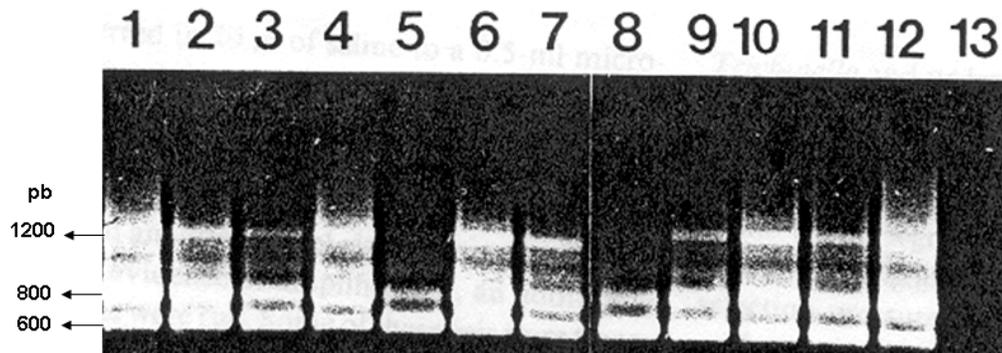


Figura 8. Productos de PCR de 13 aislados de *T. spiralis* usando los iniciadores pPRA. Carril 1, aislado de cerdo; Carril 2, de osos negro de Pennsylvania; Carril 3, colectado de cerdo de Canadá; Carril 4, PenR1; Carril 5, rata de Nueva Zelanda; Carril 6, PB; Carril 7, PenP3 rata; Carril 8, rata de Hong Kong; Carril 9, gato de Londres; Carril 10, TRL; Carril 11, gato de España; Carril 12, P1; Carril 13, aislado de humano en Japón. La heterogeneidad del fragmento de 1.6 Kb se observa en el carril 3, donde el fragmento de 1,200 pb presenta un bajo número de copias. En el carril 5 y 8 los dos aislados de rata no presentan éste fragmento. En el aislado japonés no se amplificó el fragmento de 1.6 Kb. Tomado de Dick y col., 1992.

En estudios epidemiológicos realizados en mataderos del Estado de México, se determinó la presencia de *Trichinella* en caballos con diferente grado de infección, en los que se recuperaron de 1 a 10 LM por cada diez gramos de carne analizada. Es importante señalar que la mayoría de estos caballos fueron traídos de distintas regiones del país y la especie se identificó como *T. spiralis* por medio de la prueba de PCR empleando los oligonucleótidos pPRA, amplificando fragmentos de 600, 800 y 1,200 pb (Uribe y col., 2003). Trejo y colaboradores (2004) reportaron sólo un producto de 600 pb de un aislado de *T. spiralis* recuperado de un caballo del matadero de Río Frío Estado de México, y en dos muestras más obtuvieron amplificadas de 600 y 800 pb.

Viveros y colaboradores (2001) analizaron por PCR y los oligos pPRA, 90 muestras de músculos de caballos de un matadero TIF del norte del país y obtuvieron un fragmento de 800 pb en dos muestras. También analizaron muestras de músculo de caballos provenientes de un matadero rural y obtuvieron amplificaciones de 600 y 800 pb en once muestras. Aunque, en algunas otras muestras se obtuvo un fragmento de 1,200 pb, cabe señalar que este producto sólo ha sido reportado por Dick y colaboradores (1992) en aislados de animales domésticos (cerdos, gatos y ratas), describiendo que no todos los aislados domésticos considerados como *T. spiralis* presentan el amplificado de 1,200 pb. Los resultados obtenidos en estos estudios con caballos de rastros rurales y TIF de México, sugieren una divergencia genética en las secuencias del segmento de 1.6 Kb de *T. spiralis* lo que es de gran interés para la taxonomía, identificación y diagnóstico de la triquinelosis.

La variabilidad genética en las diferentes especies de *Trichinella* ha sido puesta de manifiesto por Bandi (1993) y Wu (1998), en estudios de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) de *T. britovi*, *T. nativa*, *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, T5, T6 y T8. Los análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), sobre secuencias de ADN específicas de varias especies de *Trichinella* (*T. britovi*, *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis* y los genotipos T5, T6 y T8), obtenidos de diferente origen geográfico, han sido útiles para distinguir a las especies de estos nemátodos (Nagano y col., 1999; Wu y col., 1999; Kwon y col., 2001). También el análisis del ADNr del parásito por PCR empleando los iniciadores oTsr 1 y 4 que flanquean la región conocida como segmento de expansión 5, permite diferenciar entre aislados de *T. spiralis* y las otras especies de *Trichinella* (Figura 9). Así mismo, estos métodos moleculares han puesto de manifiesto la heterogeneidad poblacional del género *Trichinella* de diferentes zonas geográficas (Zarlenga y col., 1996).

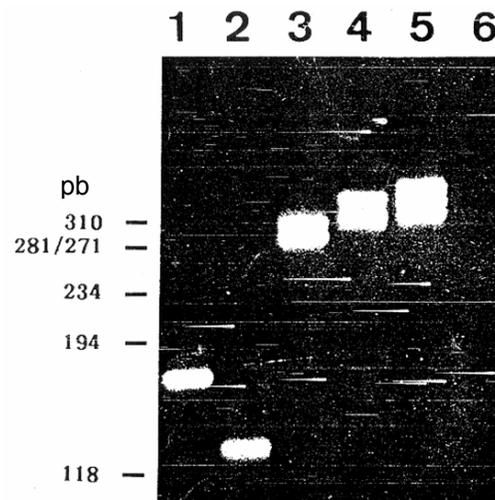


Figura 9. Amplificación del segmento de expansión 5 del ADNr de *Trichinella* por PCR utilizando los iniciadores oTsr 1 y 4, a partir del ADN genómico obtenido de: 1) *T. spiralis*; 2) *T. nativa*; 3) *T. pseudospiralis*, Rusia; 4) *T. pseudospiralis*, Norte América; 5) *T. pseudospiralis*, Australia; 6) control negativo hígado de ratón. Tomado de: Zarlenga y col., 1996.

De hecho, la amplia variabilidad identificada dentro del SE-V del IsADNr, ha proporcionado elementos para diferenciar a las especies de *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* y *T. nelsoni* de todos los demás genotipos silvestres de *Trichinella*. Esta variabilidad en el SE-V (entre 285 y 360 pb) también se presenta entre aislados de *T. pseudospiralis* de diferentes orígenes geográficos (Rusia, Australia y Norteamérica) (Zarlenga y col., 1996). Zarlenga y colaboradores (1999), desarrollaron una prueba de PCR múltiplex que amplifica varios locus del ADNr en una sola reacción, utilizando iniciadores específicos que reconocen y flanquean las secuencias conocidas como SE e ITS del ADNr del parásito (Figura 10). Se ha sugerido que esta prueba de PCR múltiplex podría ser utilizada como herramienta de diagnóstico específico y sensible de esta parasitosis.

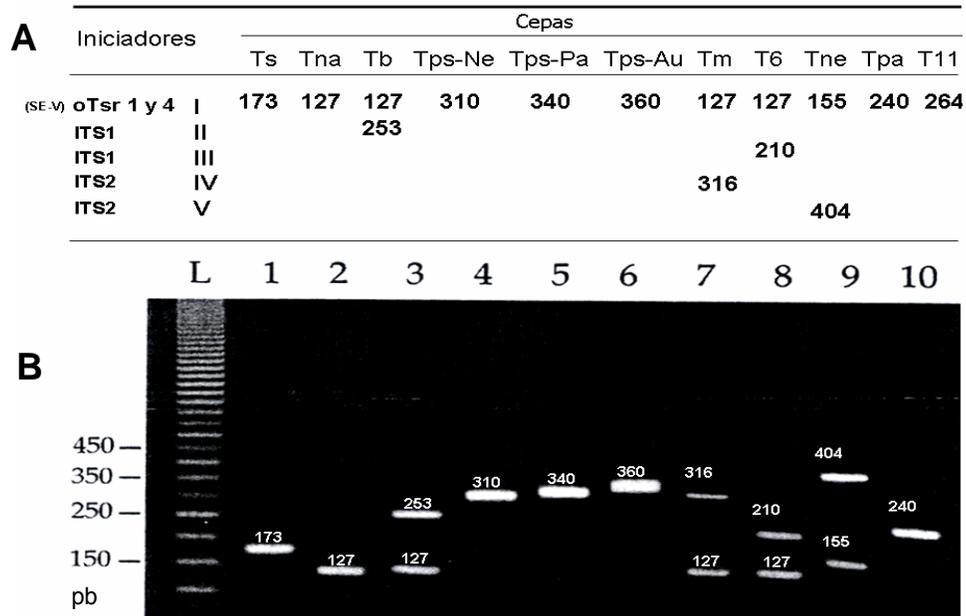


Figura 10. Origen de los iniciadores utilizados en el PCR múltiplex y tamaño de los productos de PCR que se obtienen con cada uno de ellos para cada una de las especies de *Trichinella*. A) Tabla que indica el tamaño de los productos que se obtiene para cada uno de las especies y genotipos del parásito, con los iniciadores oTsr 1 y 4, además de cuatro juegos de oligos más. B) Peso de los productos de PCR amplificados con los iniciadores de la Tabla A. Abreviaturas: L, marcadores de peso molecular (PM) de 100 pb; Carril 1, *T. spiralis* (Ts); Carril 2, *T. nativa* (Tna); Carril 3, *T. britovi* (Tb); Carril 4, *T. pseudospiralis* (Tps) de la región Nórdica (Ne); Carril 5, *T. pseudospiralis*, Peleártica (Pa); Carril 6, *T. pseudospiralis*, Australia (Au); Carril 7, *T. murrelli* (Tm); Carril 8, *Trichinella* T6 (T6); Carril 9, *T. nelsoni* (Tne); Carril 10, *T. papuae* (Tpa) y *Trichinella* T11 (T11). Tomado de: Pozio y La Rosa, 2003.

De cualquier manera, el ensayo de PCR múltiplex no permite analizar la variación que presentan estas secuencias entre o dentro de genotipos individuales, es decir, dentro de un mismo aislado o entre los mismos individuos. Sin embargo, la búsqueda de mutaciones puede realizarse mediante el ensayo de Polimorfismo Conformacional de Cadenas Sencillas (SSCP's), que permite evaluar la variación entre las poblaciones con un alto grado de resolución, señalando las diferencias en las secuencias mediante la formación de estructuras secundarias de ADN de cadena sencilla en fragmentos o secuencias específicas obtenidos por PCR (Orita y col., 1989).

El ensayo de SSCP se realiza mediante la desnaturalización de ADN de doble cadena a 95°C y su inmediata renaturalización en congelación. La electroforesis en geles de poliacrilamida muestra la migración de fragmentos de ADN amplificados por PCR en función de su estructura conformacional y su peso molecular; la sensibilidad de la técnica permite la diferenciación de fragmentos de ADN que presentan mutaciones puntuales hasta en un 90%, originando conformación de estructuras secundarias de cadena sencilla (Orita y col., 1989; Gasser y col., 1998). Aunque este ensayo presenta alta capacidad de resolución, su principal desventaja se asocia con la necesidad de obtener amplificados marcados con radioactividad (usualmente fragmentos de ~ 150 a 550 pb); sin embargo, se han podido superar estas limitantes con el desarrollo del método de SSCP no radioactivo, como lo describen Gasser y colaboradores (2004), que han analizado la variación de las secuencias en los locus del ADNr dentro o entre todas las especies y genotipos de *Trichinella* reconocidos hasta ahora.

Justificación

Estudios previos realizados a través del análisis de la secuencia del IsADNr de *Trichinella* han mostrado variabilidad genética en aislados del parásito, dependiendo del origen geográfico y del tipo de hospedero del que fueron obtenidos. En México se ha reportado la presencia de *T. spiralis* en caballos de mataderos rurales y TIF que provienen de diferentes regiones geográficas del país. El análisis por PCR del ADN genómico de caballos de estos mataderos empleando los iniciadores pPRA, mostró buena sensibilidad de detección aunque las diferencias genéticas entre las poblaciones de *T. spiralis* no son concluyentes. Considerando lo anterior, resulta de interés determinar la variabilidad genética entre aislados del parásito obtenidos de caballos de diferentes regiones del país. La presencia de variabilidad genética se puede estudiar de manera precisa mediante el análisis de secuencias repetidas del genoma de diferentes poblaciones de *T. spiralis*. La amplificación del SE-V de *T. spiralis* de muestras de caballo colectadas de diferentes regiones geográficas de México y su análisis por SSCP permitirá obtener información preliminar relacionada con la presencia de variabilidad genética en poblaciones de *T. spiralis*. La relación de la divergencia genética con características biológicas del parásito, tales como capacidad reproductiva, antigenicidad, patogenicidad, resistencia a fármacos, entre otras, puede ser importante para el control de esta zoonosis presenta en nuestro país.

Objetivo general

Determinar la variabilidad genética de los aislados de *Trichinella spiralis* obtenidos de caballos de distintas regiones de México.

Objetivos específicos

- Analizar la presencia de *Trichinella* en muestras de caballo de los mataderos 5 de Junio en San Vicente Chicoloapan y Ángel García Peralta en Río Frío Estado de México por métodos parasitológicos.
- Identificar y caracterizar la presencia de *Trichinella spiralis* en los aislados obtenidos de las muestras de caballo, mediante PCR múltiple y PCR empleando los iniciadores pPRA.
- Establecer la variabilidad genética de los aislados de *Trichinella spiralis* mediante la amplificación del segmento de expansión V (SE-V) del ADNr del parásito y su análisis mediante la técnica de SSCP no radiactivo.

Hipótesis

La amplia distribución geográfica de *T. spiralis* puede ser causa de variabilidad genética poblacional. Esta variabilidad se reflejará en el análisis por SSCP no radiactivo de la secuencia del SE-V del ADNr de las cepas de *T. spiralis* obtenidas de caballos de distintas regiones de México.

Material

Enzimas

Pepsina de mucosa gástrica porcina (SIGMA, Cat. No. P7125-500G)

Proteinasa K 100 mg (Fungal) (> 20 U/mg) (GIBCO BRL, Cat. No. 25530-015)

Ribonucleasa A de páncreas bovino, (RNAasa) (SIGMA, Cat. No. R6513-1G)

Enzima ADN Taq polimerasa Platinum (Invitrogen,TM Cat. No. 10966-030)

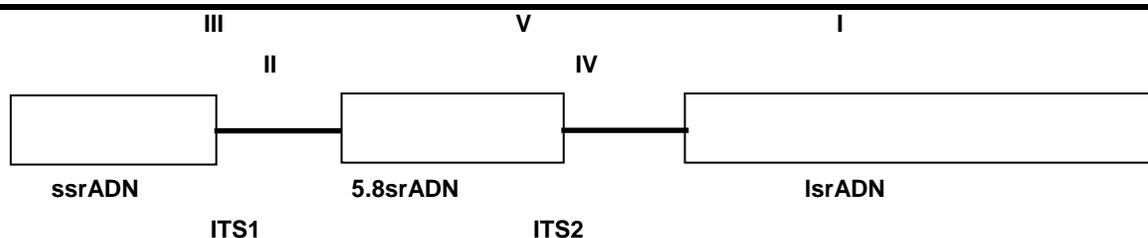
Enzima ADN Taq polimerasa, mantenida en buffer B (Promega, Cat. No. M1665).

Oligonucleótidos

PRC múltiplex

Tabla 3. Iniciadores empleados en el ensayo de PCR múltiplex (Sigma Genosys Parking Slip).

Iniciadores	Localización en el ADNr	Secuencias
I	SE-V	5' GTTCATGTGAACAGCAGT 3'
		5' CGAAAACATACGACAACTGC 3'
II	ITS1	5' GCTACATCCTTTTGATCTGTT 3
		5' AGACACAATATCAACCACAGTACA 3'
III	ITS1	5' GCGGAAGGATCATTATCGTGT 3'
		5' ATGGATTACAAAGAAAACCATCACT 3'
IV	ITS2	5' GTGAGCGTAATAAAGGTGCAG 3'
		5' TTCATCACACATCTTCCACTA 3'
V	ITS2	5' CAATTGAAAACCGCTTAGCGTGTTT 3'
		5' TGATCTGAGGTCGACATTTCC 3'



- Cada juego de iniciadores se generaron ha partir del alineamiento de ambas secuencias SE-V y ITS en las regiones repetidas del ADNr de cada genotipo de *Trichinella*. Los genotipos de *Tichinella* y el tamaño de los fragmentos de ADN generados por el PCR múltiplex para cada especie son: *T. spiralis*, 173 pb; *T. nativa*, 127 pb; *T. britovi*, 127 pb y 253 pb; *T. pseudospiralis*, 310 pb (Russia), 340 pb (Tasmania) y 360 pb (USA); *T. murrelli*, 127 pb y 316 pb; T6, 127 pb y 210 pb; *T. nelsoni*, 155 pb y 404 pb; *T. papuae*, 240 pb; T11 264 (Zarlenga y col., 1999; 2001).

PCR sencillo (para amplificar secuencias del fragmento 1.6 Kb reportado para *T. spiralis*/pPRA)

1

pPRA 203-206 5' GTAAAGCGGTGGTGCGTATTCCAT^{3'} (Invitrogen Custom Primers)

3

pPRA 804-781 5' AGTTTGCATACCGAACAACCGCTC^{3'} (Invitrogen Custom Primers).

PCR sencillo con oligonucleótidos oTsr 1 y 4 (iniciadores I, en Tabla 3)

oTsr4 5' GTTCCATGTGAACAGCAGT^{3'} (Sigma Genosys Parking Slip)

oTsr1 5' CGAAAACATACGACAACTGC^{3'} (Sigma Genosys Parking Slip)

PCR-SSCP

SE-V oTsr3 5' GCGATTGAGTTGAACGC^{3'} (Invitrogen Custom Primers)

oTsr4 5' GTTCCATGTGAACAGCAGT^{3'} (Invitrogen Custom Primers)

Nucleótidos

Mezcla de dNTP's 10 mM (2'-desoxinucleótido 5'-trifosfato), (Invitrogen, life Technologies, Cat. No. 18427-088).

50 bp DNA Step Ladder (Promega product information, Cat. No. G4521).

TrackIt™ 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, life Technologies, Cat. No. 10488-058).

Estuches comerciales

Wizard® SV Genomic DNA Purification System, Promega, Cat. No. A2360.

Unidades de filtración Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices, Millipore, Cat. No. UFC7 PCR 50.

Métodos

Diseño Experimental

Para este estudio se consideraron dos mataderos de caballos del Estado de México, uno en San Vicente Chicoloapan que reciben animales del Estado de México, Toluca, Tampico, Veracruz, Chiapas y Tabasco; Río Frío, que sacrifica ganado equino procedente los Estados de Guerrero, Veracruz, Chiapas, Tabasco y Puebla. El tamaño de la muestra se determinó en base al volumen de matanza anual, bimestral, por mes y por día para obtener un tamaño de muestra representativo, sin considerar la edad y sexo de los animales. Se recopiló información sobre la procedencia de los animales, para ubicarlos dentro del territorio nacional y así determinar la frecuencia de infestación. Además, se incluyeron en este estudio muestras de diafragma de caballos de una planta TIF del Estado de Aguascalientes y del rastro rural San Vicente Chicoloapan, que en un estudio previo resultaron positivas para *T. spiralis* por PCR empleando los iniciadores pPRA (Viveros y col., 2001). Con la finalidad de analizar la variabilidad de los aislados de *T. spiralis* obtenidos de otros hospederos, se incluyeron en este estudio dos aislados del parásito, obtenidos de cerdo en la ciudad de Zacatecas, Zacatecas, México.

Calculo del tamaño de la muestra

Para efectos de este estudio, el tamaño de la muestra se determinó con la fórmula descrita por Abad y Servin, (1989) que se describe a continuación:

$$1) n = \frac{n_0}{1 + (n_0 / N)}$$

donde:

$$2) n_0 = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Para estimar n_0 dentro de un grado de confianza y precisión establecidas, donde:

p = Proporción de la característica 0.05

q = Diferencia sin la característica 0.95

Z^2 = Grado de exactitud (este valor está determinado por la curva de distribución de $Z = 1.96$)

d^2 = Grado de precisión en el muestreo (donde: $d = 0.05$).

Se consideró el volumen de animales sacrificados en el último año para los mataderos del Edo. de México, en promedio es de 37, 173 y 38, 000 caballos respectivamente, el calculo del tamaño de la muestra se describe de la siguiente manera;

a) Volumen de matanza mensual: $37, 173 / 12 = 3097.75$

b) Volumen de matanza bimestral: $3097.75 \times 2 = 6195.5$

Sustituyendo en la fórmula 2:

$$n_0 = \frac{(1.96)^2 (0.05) (0.95)}{(0.05)^2} =$$

$$n_0 = \frac{(3.8416) (0.0475)}{(0.05)^2} =$$

$$n_0 = \frac{0.182476}{0.0025} = 72.9904$$

Sustituyendo en la formula 1:

$$n = \frac{72.9904}{1 + (72.9904/6195.5)} =$$

$$n = \frac{72.9904}{1 + 0.011781196} =$$

$$n = \frac{72.9904}{1.011781196} = 72.14049865$$

Globalizando:

$$n = 72.14049865 \cong 73$$

Con el objeto de obtener mayor número de muestras de caballos que llegan de las diferentes regiones del país, se decidió ampliar el tamaño de la muestra hasta 100 en cada matadero, bajo la siguiente distribución:

$100 / 10 \text{ semanas} = 10 \text{ muestras por semana.}$

Con la finalidad de que cualquier caballo tenga la misma posibilidad de ser elegido en el muestreo se procedió de la siguiente manera:

Para obtener 10 muestras por semana se considero el volumen de matanza del día y se dividió entre el número total de muestras:

Ejemplo: $90 \text{ animales a sacrificio} / 10 = 9$

Se eligió un número al azar entre el 1 y el 9, se escogió el 6. Al momento del sacrificio, la toma de muestras se inicio con el caballo número 6 en línea de sacrificio y en los siguientes especímenes se realizó una sumatoria entre el número 6 y 9 como se ilustra en la Tabla 4.

Tabla 4. Muestreo sumatorio.

No. Muestra	Muestreo sumatorio	No. Caballo en la línea de sacrificio
1	$6 + 9 = 15$	6
2	$15 + 9 = 24$	15
3	$24 + 9 = 33$	24
4 Σ^*	$33 + 9 \Sigma^*$	33 Σ^*

▪ Σ^* Se procedió hasta concluir la selección de 10 caballos para la obtención de muestras.

Toma de muestras

De cada caballo se tomaron 50 g de los músculos del diafragma, debido a que son las partes donde el parásito se aloja con mayor frecuencia (Pozio y col., 1999). Las muestras se colocaron en bolsas de plástico nuevas y limpias, bien identificadas y transportadas en hielo al Laboratorio de Investigación en Parasitología de la Unidad de Investigaciones Médicas en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se tomaron 40 g de tejido para ser analizado por digestión

artificial y los 10 g restantes se utilizaron para extraer ADN genómico para identificar y determinar la presencia de *Trichinella spiralis* mediante PCR múltiplex con los iniciadores descritos en la Tabla 3 reportados por Zarlenga y colaboradores (2001), también se emplearon los iniciadores pPRA descritos para *T. spiralis*.

Digestión artificial

Para determinar la presencia del parásito por métodos parasitológicos, se llevó a cabo la digestión artificial de las muestras de acuerdo a lo descrito por la OIE, (2000). Todas las muestras de tejido muscular de los dos mataderos se molieron en una Picadora plus de Muolinex. Se tomaron 40 g de carne y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, para ser tratados con la solución de digestión (todas las soluciones y reactivos utilizados se encuentran en el ANEXO I) durante 3 h a 37°C en agitación constante, en un volumen final de 300 mL. Enseguida, las muestras digeridas se colocaron en el embudo de Bearman modificado, para filtrarse por gravedad en tubos Falcon de 15 mL durante 30 min. Posteriormente, al precipitado obtenido se le realizaron dos lavados con solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS 1X) para retirar los restos de tejido muscular y solución de digestión. Se retiró la mayor parte de líquido hasta tener un volumen final de 1 mL y se añadieron 9 mL de PBS 1X, se agitó vigorosamente y se dejó sedimentar por 20 min. La solución de lavado se retiró dejando 1 mL, el cual, se recuperó y se colocó en tubos para microcentrifuga de 1.5 mL, se añadieron 500 µL de PBS 1X y se agitó vigorosamente, se centrifugó a 10,000 r.p.m durante 5 min, se eliminó la fase acuosa y el botón obtenido se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. Finalmente, se analizó en el microscopio invertido con los objetivos de 10 y 40 aumentos (OIE, 2000). Este mismo procedimiento se aplicó a las ratas de la cepa *Sprague Dawley* infectadas experimentalmente con la cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91 obtenida de cerdo (ANEXO II, se encuentra el modelo biológico de *T. spiralis*), para obtener LM, a partir de las cuales se purificó el ADN, incluido como control positivo en los ensayos de PCR. Como controle negativos se utilizó ADN purificado de músculos de caballo y ratón sin infectar.

Extracción de ADN

Para determinar la presencia del parásito en las muestras de carne de caballo de los mataderos, se procedió a purificar el ADN genómico total de éstas. Se incluyeron también 15 muestras de diafragma de caballos (3 de un matadero TIF de Aguascalientes procedentes del Estado de San Luís Potosí y 12 del rastro "5 de Junio" originarios del Estado de Veracruz), y otras 3 muestras de sangre (1 de la planta TIF procedente del Estado de San Luís Potosí y 2 del rastro "5 de Junio" traídos del Estado de Veracruz), las cuales resultaron positivas para la presencia del parásito en un estudio previo por PCR empleando la secuencia pPRA. (Viveros y col., 2001). Además, se consideraron 2 aislados de *T. spiralis* recuperados de cerdo en 1976 y 2000 respectivamente, procedentes del Estado de Zacatecas (Unidad de Biología Experimental, Universidad Autónoma de Zacatecas).

Para la obtención del ADN se utilizaron dos estrategias: 1) empleando un estuche comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System de Promega, siguiendo las recomendaciones del proveedor; y 2) mediante la técnica de Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, descrita por Jiménez y colaboradores (2004). Se tomaron 0.5 g de cada muestra de tejido muscular de los caballos y se molieron con nitrógeno líquido, el material biológico se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y se realizaron dos lavados con PBS 1X.

Las muestras se resuspendieron en 500 μ L de una solución de lisis de ADN en frío, se añadió proteinasa K a una concentración final 0.1 mg/mL y SDS a una concentración final de 0.5%, y se incubaron a 50°C durante toda la noche. La extracción de ADN se realizó por extracciones sucesivas con fenol, fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y cloroformo-alcohol isoamílico. En todas las extracciones se recuperó la fase acuosa y colocó en un tubo nuevo y estéril, al finalizar las extracciones se eliminó el ARN con Ribonucleasa A de páncreas bovino (RNAasa, SIGMA, Cat. No. R6513-1G) a una concentración final de 20 μ g/mL, durante 30 min a

37°C. Se realizó una última extracción con fenol-cloroformo alcohol isoamílico y en la fase acuosa se precipitó el ADN con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por 30 min a -20°C. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 13, 000 r.p.m a 4°C, el botón obtenido se lavó con etanol al 80% y se resuspendió en 50 µL de agua bidestilada. La concentración y pureza de ADN se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm. Las muestras se almacenaron hasta su uso a -20°C.

Análisis de las muestras mediante PCR múltiplex

Para determinar la presencia de ADN del parásito en las muestras colectadas e identificar la especie de *Trichinella* se consideró aplicar un método de análisis molecular de PCR múltiplex.

En este ensayo se realizó la amplificación del SE-V y de los espacios transcritos internos (ITS) del ADNr, a partir del ADN genómico de las muestras. Como control negativo se incluyó ADN de carne de caballo y ratón sin infectar y como control positivo, ADN de 1000 LM de *T. spiralis* (cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91, obtenida de cerdo).

La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 50 µL que incluyen: amortiguador de la enzima 10X, MgCl₂ 50 mM, la mezcla de dNTP's 10 mM, la mezcla de iniciadores I, II, III, IV y V (10 pmol/µL cada uno) (Tabla 3), 500 ng de ADN genómico, Taq DNA polimerasa platinum 5 U/µL (Invitrogen) y agua inyectable c.b.p 50 µL.

El programa de amplificación que se siguió es el descrito previamente por Pozio y La Rosa (2002). Se empleó un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 20 seg, 58°C por 30 seg y 72°C por 1 min, finalizando con un ciclo de extensión a 72 °C por 4 min.

Análisis de las muestras mediante PCR empleando la secuencias pPRA

La amplificación de las secuencias del fragmento de 1.6 Kb del ADN genómico de *T. spiralis* se realizó por PCR usando los iniciadores pPRA. Se utilizó como control negativo ADN de carne de caballo y ratón sin infectar, como control positivo ADN de 1000 LM de *T. spiralis* (cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91, obtenida de cerdo).

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía; amortiguador de la enzima 10X, $MgCl_2$ 25 mM, mezcla de dNTP's 10 mM, 10 pmol/ μ L de los cebadores pPRA de 203-206 (1) y 804-781 (3) respectivamente, 500 ng de ADN blanco, enzima ADN Taq polimerasa 5 U/ μ L (Promega), agua inyectable c.b.p 50 μ L.

El programa de amplificación empleado fue: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 min, seguido por 30 ciclos a 95°C por 50 seg, alineación a 58°C por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min, finalizando con un ciclo de extensión a 72°C por 7 min (Dupouy-Camet y col., 1991).

Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de amplificación se separaron según su peso molecular por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, usando como amortiguador de corrimiento TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), con un voltaje de 10 V/cm (Zarlenga y col., 2001). Los geles se visualizaron en un sistema fotodocumentador para el análisis de geles, GeneFlash de SYNGENE.

Polimorfismo en la Conformación de Cadena Sencilla no radiactivo (SSCP's)

Previo al análisis del SE-V mediante con el ensayo de SSCP, se realizaron amplificaciones de las secuencias del SE-V del IsADNr del parásito presente en las

muestras positivas, usando los iniciadores oTsr 3 (5' GCG ATT GAG TTG AAC GC 3') y oTsr 4 (5' GTT CCA TGT GAA CAG CAGT 3'). Como controles negativos se utilizaron ADN de carne de caballo y ratón sin infectar, como control positivo ADN de 1000 LM de *T. spiralis* (cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91, de cerdo).

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía: Amortiguador de la enzima 10X, $MgCl_2$ 50 mM, mezcla de dNTP's 10 mM, 10 pmol/ μ L de los oligos oTsr 3 y 4, 500 ng de ADN blanco, enzima ADN Taq polimerasa platinum 5 U/ μ L (Invitrogen).

El programa de amplificación que se utilizó es el descrito por Gasser y colaboradores (2004). Se empleó un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, alineamiento a 55°C durante 30 seg, extensión a 72°C por 5 min.

Los fragmentos de amplificación se separaron según su peso molecular por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, usando como amortiguador de corrimiento TBE 1X, teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), con un voltaje de 10 V/cm (Zarlenga y col., 2001). El gel se visualizó en un sistema fotodocumentador para el análisis de geles, GeneFlash de SYNGENE.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con un estuche comercial (Unidades de filtración Montage PCR, Centrifugal Filter de Millipore, Cat. No. UFC7PCR50) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se tomaron 10 μ L (entre 300 y 400 ng) de los productos amplificados y purificados de cada muestra y se mezclaron con 5 μ L de amortiguador de carga (95% formamida, 10 mM NaOH, 20 mM EDTA, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% xilen cianol) (Orita y col., 1989).

Los productos se desnaturalizaron a 95°C por 10 min, e inmediatamente se colocaron en hielo por 10 min. Posteriormente las muestras se cargaron en el gel de acrilamida:bisacrilamida (49:1, al 30%) al 7.5 % (dimensiones 20 cm larga x 20 cm alto x 1 mm de ancho), que contenía glicerol al 5%. La electroforesis se realizó en un sistema para geles PROTEAN II xi Cell (BIO-RAD), a una temperatura constante de 20°C a 30 mA por 4 h, conectado a un sistema de enfriamiento Fisher Scientific/ISOTEM-1016P (Pinheir y col., 1999; Gasser y col., 2005). El gel fue teñido con plata siguiendo el protocolo descrito por Caetano-Anollés y Gresshoff (1994).

Análisis de datos del SSCP's

El análisis de SSCP se realiza, en general, detectando los cambios en la migración electroforética de las bandas que representan a las cadenas sencillas del fragmento de PCR amplificado. Sin embargo, algunas veces, como es el caso en esta tesis, al desnaturalizar los fragmentos amplificados se observan una gran cantidad de bandas, esto ha sido reportado antes (Pinheir y col., 1999; Gasser y col., 2005). Por esto, y solo de manera descriptiva se realizó un análisis del gel utilizando la presencia/ausencia de bandas, como si cada una de ellas fuera un locus dominante. Se asignaron valores numéricos consecutivos para las bandas únicas en cada una de las muestras, tomado como referencia el control positivo. Para cada nivel de análisis se construyó una matriz de datos de 0 para ausencia y 1 para presencia. Para cada banda se calculó la tasa de polimorfismo y la proporción de loci (bandas) polimórficos, ambas son medidas que cuantifica la diversidad genética intrapoblacional con base en el número de variantes (IPGRI y Cornell University, 2004). El polimorfismo o tasa de polimorfismo (P_j) indica que, un gen es polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 ó 0.99, y se enuncia como:

$$P_j = q \leq 0.95 \text{ ó } P_j = q \leq 0.99$$

Donde:

P_j = tasa de polimorfismo

q = frecuencia alélica

La proporción de loci (bandas) polimórficos es el número de loci plomórficos dividido entre el número total de loci (polimórficos y monomórficos). Expresa el porcentaje de loci variables en una población, se expresa como:

$$P = n_{pj}/n_{total}$$

Donde:

P = la proporción de loci polimórficos

n_{pj} = el número de loci polimórficos

n_{total} = el número total de loci

(IPGRI y Cornell University, 2004)

Resultados

Análisis de las muestras de caballo por digestión artificial

El análisis por el método de digestión artificial no mostró la presencia de LM de *Trichinella*, en ninguna de las muestras de tejido muscular provenientes de los mataderos San Vicente y Río Frío, a pesar de que se utilizaron 40 g de carne para este análisis.

Extracción de ADN

De las dos metodologías utilizadas para la extracción de ADN genómico de las muestras de tejido muscular de caballo, así como de controles negativos y positivos, se determinó que la técnica Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico, es más eficiente, el material genético obtenido es de mejor calidad e integridad y de mejor rendimiento que el obtenido con el estuche comercial de purificación (Wizard® SV Genomic DNA Purification System), (Figura 11).

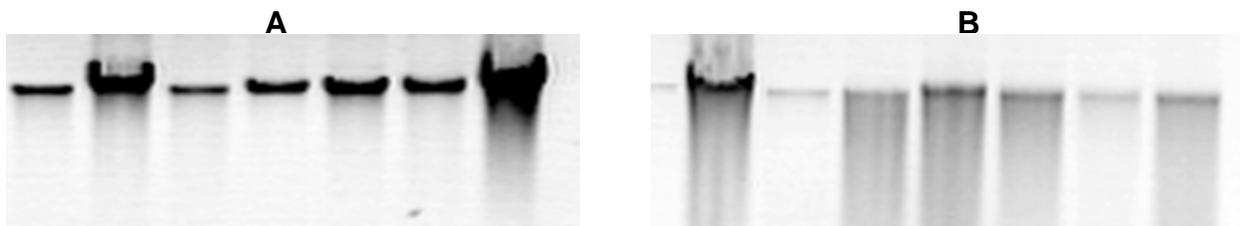


Figura 11. ADN obtenido del tejido muscular de caballos A) con la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico y B) con el estuche comercial Wizard® SV Genomic DNA Purification System. El ADN de las muestras de músculo se extrajo paralelamente con las dos técnicas. El rendimiento e integridad del ADN, fue más eficiente con la técnica de fenol cloroformo alcohol isoamílico ya que se obtienen concentraciones superiores a los 800 ng/ μ L/0.5 g de tejido. Con el estuche comercial se obtienen concentraciones de 300 a 500 ng/ μ L/0.5 g de tejido. En ambos geles se cargaron 5 μ L de muestra en cada carril. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL.

Determinación de la presencia y caracterización de la especie de *Trichinella spiralis* en músculo de caballo mediante PCR múltiplex

Para determinar la presencia y caracterizar la especie de *Trichinella* en los músculos de caballos se empleó el PCR múltiplex, ya que podría ser una herramienta de diagnóstico en estudios posteriores. Las condiciones del PCR se estandarizaron empleando ADN de LM de *Trichinella spiralis* purificadas del músculo de ratas *Sprague Dawley* infectadas experimentalmente con cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91, obtenida de cerdo. Como puede observarse en la Figura 12, empleando diferentes cantidades de ADN del parásito, se amplificó un producto de 173 pb, correspondiente al SE-V del ADNr de *T. spiralis*. Cuando se emplearon 50, 100 y 250 ng de ADN del parásito, se observa de manera cualitativa que el número de copias generadas es semejante, sin embargo, a partir de 500 ng se obtiene un mayor número de estas. Para el análisis de las muestras de ADN del diafragma de caballos por PCR múltiplex, se decidió usar 500 ng de ADN total.

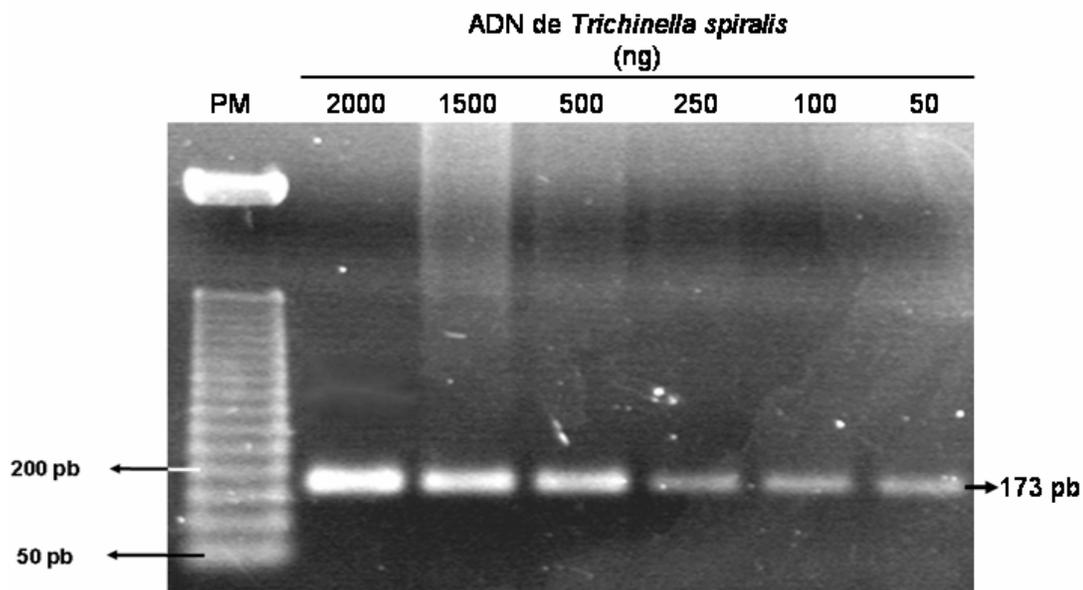


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR múltiplex amplificados del ADN genómico obtenido de LM de *T. spiralis*, a diferentes concentraciones de ADN inicial del control positivo. Marcadores de peso molecular (PM) de 50 pb. Se observa un fragmento de 173 pb, que corresponden al SE-V del ADNr de *T. spiralis*.

Inicialmente se analizaron por PCR múltiplex 100 muestras de ADN genómico obtenido de músculos del diafragma de caballos, que se sacrificaron en el matadero San Vicente. En la Figura 13, se presentan los resultados obtenidos con algunas de las muestras analizadas, observándose la amplificación de un fragmento 173 pb en el control positivo (carril 1), que corresponde al SE-V del ADNr de LM de *T. spiralis*, sin embargo, en las demás muestras analizadas no se obtuvo el producto de amplificación esperado, indicando que éstas son negativas para *Trichinella spiralis*.

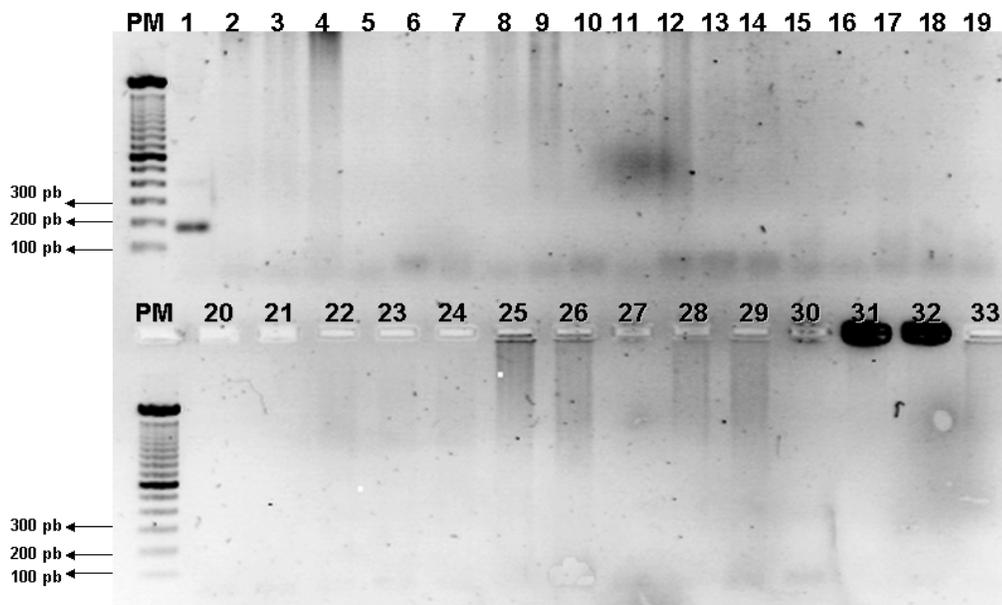


Figura 13. Análisis de 28 muestras de ADN obtenido de diafragma de caballos del matadero San Vicente mediante PCR múltiplex. No existe ninguna muestra positiva. PM 100 pb. Carril 1, control positivo LM de *T. spiralis*; Carril 2, control negativo ADN de ratón no infectado; Carril 3 y 4, control negativo con 500 y 1000 ng de ADN de caballo no infectado; Carril 5, control reactivos. El fragmento amplificado tiene un tamaño de 173 pb, pertenece a la secuencia del SE-V del ADNr de *T. spiralis*. Gel de agarosa al 2%.

De igual modo, los resultados del análisis por PCR múltiplex del ADN obtenido de 15 muestras de diafragma y 3 de muestras de sangre de caballos colectadas con anterioridad de los mataderos TIF de Aguascalientes y San Vicente, que resultaron positivas para la presencia de *T. spiralis* por PCR con los iniciadores pPRA (Viveros y col., 2001), también resultaron negativos (Figura 14).

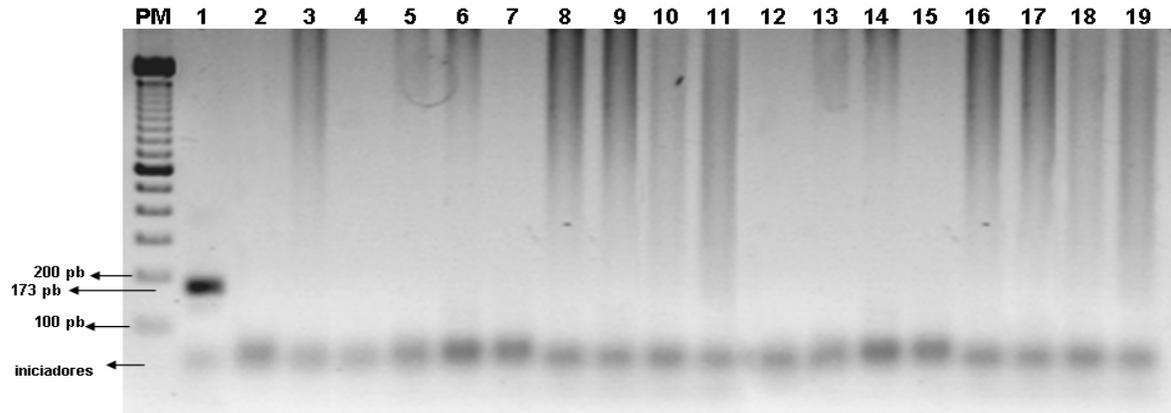


Figura 14. Análisis de 15 muestras de ADN obtenido de carne de caballos por PCR múltiplex, que en un estudio previo resultaron positivas a *T. spiralis* con secuencias pPRA. Se observa un fragmento amplificado de 173 pb correspondiente al SE-V del ADNr de *T. spiralis* en el control positivo. En el resto de las muestras no se obtuvo el producto de amplificación, indicando que son negativas. PM: 100 pb; Carril 1, control positivo LM *T. spiralis*; Carril 2, control negativo ADN de ratón no infectado; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4, control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos originarios del Edo de San Luís Potosí. Carril 8-19: caballos procedentes de Edo. de Veracruz. Gel de agarosa al 2%

Es probable que la ausencia de productos de amplificación en el PCR múltiplex se deba a la baja concentración de ADN del parásito en la muestra o de los iniciadores I, que comprende los oligos oTsr 1 y 4, (que forma parte de la mezcla de iniciadores para PCR múltiplex de la Tabla 3), que reconocen el SE-V del ADNr y que en el caso de *T. spiralis*, amplifican el producto de 173 pb. Sin embargo, al incluir en la mezcla de reacción mayor concentración de iniciadores (de 10 pmol/ μ L a 20 pmol/ μ L) y de ADN total (de 500 a 1000 ng), no se obtuvo la amplificación del producto esperado (resultados no mostrados).

No obstante, por la prevalencia de triquinosis equina demostrada en estudios previos en el matadero de San Vicente, se esperaba que algunas de las 100 muestras colectadas de este estudio presentaran la infección. Los resultados obtenidos sugieren, que el ensayo de PCR múltiple no es sensible para la detección del ADN del parásito, cuando el análisis se realiza con ADN total de tejido muscular de animales infectados.

En estudios anteriores realizados en el matadero San Vicente se ha determinado la presencia del parásito (5%), empleando el método de PCR y la secuencia pPRA como marcador molecular, de hecho ha sido posible obtener aislados de *T. spiralis* en muestras del mismo rastro (Arriaga y col., 1995; Yépez-Mulia y col., 1999; Uribe y col., 2003). Considerando lo anterior, y con el propósito de confirmar los resultados obtenidos del análisis del PCR múltiple, se procedió a analizar las muestras de ADN de los caballos de ambos mataderos por PCR utilizando la secuencia pPRA descrita para *T. spiralis*.

Determinación de la presencia de *Trichinella spiralis* en músculo de caballo empleando la secuencia pPRA

Los resultados de este análisis muestran la amplificación de dos productos específicos con pesos moleculares de 600 y 800 pb, a partir del ADN de la LM, incluidos como control positivo (Figura 15, carril 1). Estos productos corresponden a la secuencia del fragmento de 1.6 Kb de *T. spiralis* reportado en la literatura. Con respecto a las muestras colectadas en este estudio, 22/100 (22%) muestras de caballo del matadero San Vicente y 11/100 (11%) muestras del matadero de Río Frío amplificaron los productos de 600 y 800 pb, sugiriendo la presencia del parásito. En la Figura 15, carriles 5-17, se presentan algunas de las muestras de caballo analizadas procedentes de ambos mataderos que fueron positivas para *T. spiralis*, cabe señalar que todas las muestras positivas son de animales procedentes del Estado de Veracruz.

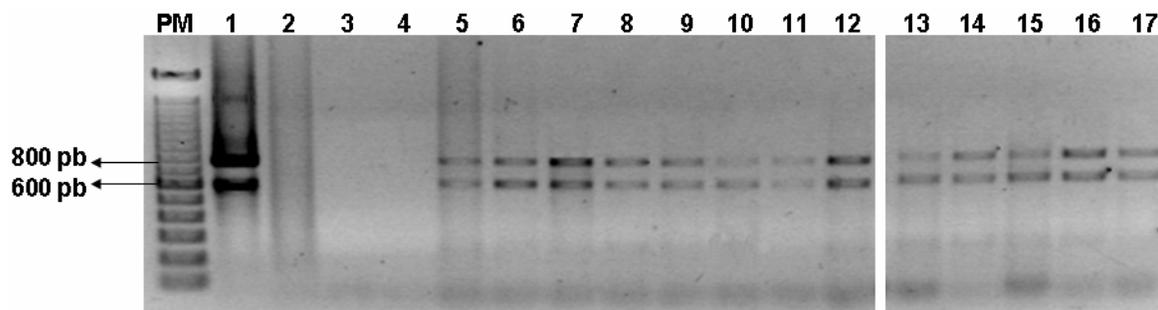


Figura 15. Análisis del ADN de músculos de caballo de los mataderos San Vicente y Río Frío, con PCR usando los iniciadores pPRA. Se observan productos amplificados de 600 y 800 pb que pertenecen a la secuencia del fragmento de 1.6 kb del ADN genómico de *T. spiralis*. PM de 100 pb. Carril: 1, control positivo LM de *T. spiralis*. Carril: 2, control negativo ADN de ratón no infectado. Carril: 3, control negativo ADN de caballo no infectado. Carril: 4, control de reactivos. Carril 5-12; muestras de caballos del matadero San Vicente. Carril: 13-17; muestras de caballos del matadero de Río Frío. Todos los animales son originarios del Estado de Veracruz. Gel de agarosa al 2%.

En la figura 16 se muestran los productos de amplificación obtenidos con las muestras de caballos, previamente determinadas como positivas para *T. spiralis* (3

del matadero TIF procedentes del Estado de San Luís Potosí y 12 del rastro 5 de Junio originarios del Estado de Veracruz; 3 muestras de sangre, 1 del Estado de San Luís Potosí de la planta TIF y 2 del matadero 5 de Junio procedentes del Estado de Veracruz). También se muestran los productos de amplificación obtenidos con los 2 aislados de cerdo. Todas las muestras analizadas amplificaron los productos de 600 y 800 pb, confirmando su positividad para la presencia del parásito. En algunas muestras de caballos procedentes de Veracruz (Figura 16, carriles 10, 13-19) se observa un amplificado de 230 pb, considerado como inespecífico.

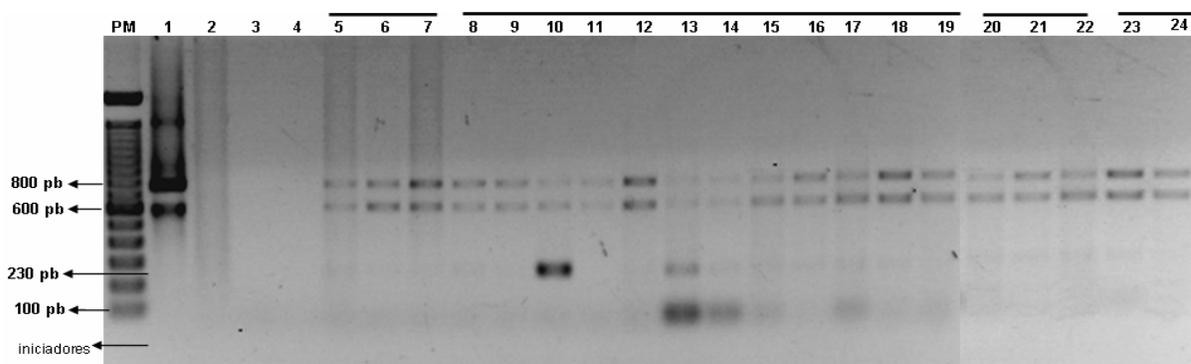


Figura 16. Productos de amplificación obtenidos del análisis por PCR y los iniciadores pPRA de 15 muestras de diafragma y 3 sangre de caballos determinadas previamente como positivas para *T. spiralis*. Se incluyeron 2 muestras de ADN de 2 aislados del parásito obtenidos de cerdo. PM de 100 pb. Carril 1, control positivo LM *T. spiralis* de porcino; Carril 2, ADN de ratón no infectado control negativo; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4, control de reactivos; Carril 5-7: músculo de caballos procedentes del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: músculo de caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo originario de San Luís Potosí; Carril 21 y 22 sangre de caballos traídos del Estado de Veracruz; Carril 23 y 24, LM de dos aislados de *T. spiralis* de cerdo 1976 y 2000 respectivamente. En las 20 muestras (carril 5-24) previamente determinadas como positivas se observan los productos de amplificación de 600 y 800 pb, que pertenece a las secuencia del fragmento de 1.6 Kb de *T. spiralis*, así como en el control positivo (carril 1). Gel de agarosa al 2%

Considerando los resultados obtenidos del análisis de las muestras de tejido de caballo por PCR múltiplex y PCR con las secuencia pPRA, se realizó un experimento de PCR comparativo usando por separado los iniciadores oTsr 1 y 4 cercanos a la región terminal 5' y 3' respectivamente del SE-V del ADNr de *T. spiralis*, que se mezclan con otros iniciadores mencionados en la Tabla 3 (PCR

múltiplex). El ensayo se realizó bajo las mismas condiciones utilizando ADN genómico de la cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91. Como se puede observar en la Figura 17, existe una diferencia cualitativa entre los dos ensayos, ya que la presencia de la banda correspondiente al producto amplificado con los iniciadores oTsr 1 y 4 por separado presenta un mayor número de copias en comparación con la banda obtenida cuando se emplearon estos iniciadores en la mezcla para el PCR múltiplex. Cabe señalar que la electroforesis se realizó con 5 μ L de los productos de PCR en las cuatro muestras. Estos resultados sugieren que el empleo de los iniciadores oTsr 1 y 4 en la mezcla para PCR múltiplex resta sensibilidad al ensayo, cuando se utiliza con el ADN total de animales infectados.

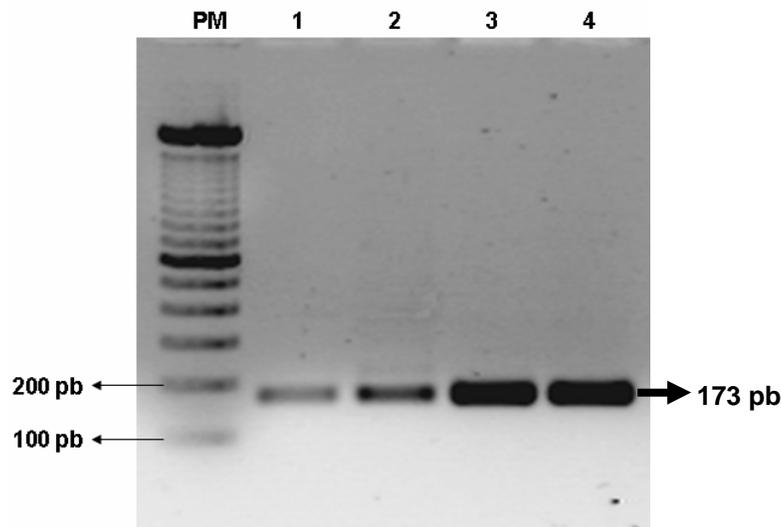


Figura 17. Producto de amplificación obtenido por PCR múltiplex empleando los iniciadores oTsr 1 y 4 en mezcla (carriles 1 y 2) ó por separado (carriles 3 y 4). El producto amplificado es de 173 pb que corresponde al SE-V del ADNr de la cepa de referencia de *T. spiralis* porcina. La intensidad de los productos amplificados en cada ensayo muestra las diferencias entre ambos de manera cualitativa. La electroforesis se realizó con 5 μ L de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%.

También se evaluó el uso de los iniciadores oTsr 1 y 4 por separado, en las muestras de diafragma positivas con las secuencias pPRA (3 del matadero TIF procedentes del Estado de San Luís Potosí y 12 del rastro 5 de Junio originarios del

Estado de Veracruz, 3 muestras de sangre de las cuales 1 procede del Estado de San Luís y 2 del Estado de Veracruz. Se incluyeron los 2 aislados de cerdo procedentes del Estado de Zacatecas). Los resultados obtenidos en estos ensayos se observan en la Figura 18; en todas las muestras se obtiene el fragmento amplificado de 173 pb confirmando la presencia de *T. spiralis* en las muestras analizadas. Cabe recordar que estas muestras resultaron negativas cuando los iniciadores fueron empleados en mezcla dentro del PCR múltiplex.

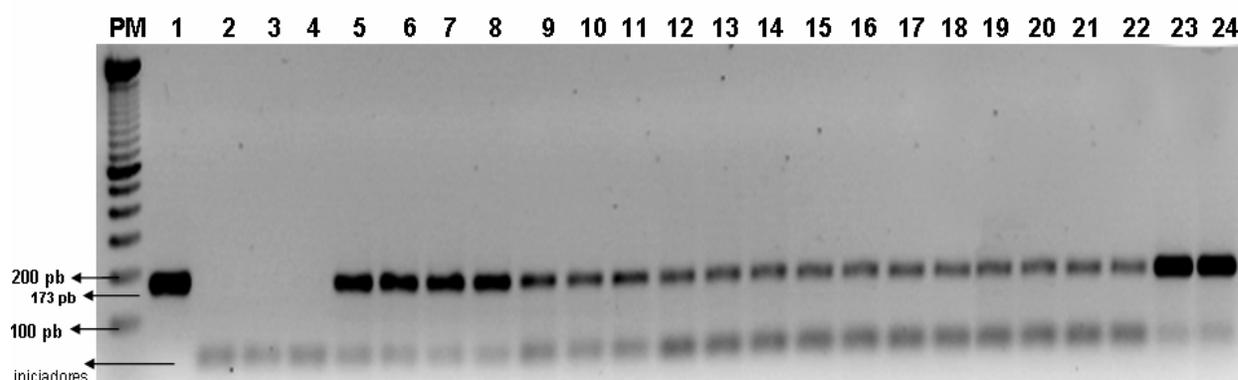


Figura 18. Análisis de las muestras de ADN de caballo positivos a *T. spiralis* (con la secuencia pPRA) y aislados de *T. spiralis* de cerdo mediante PCR usando los iniciadores oTsr 1y 4 (oligos I en Tabla 3). En todas las muestras se observa un amplificado de 173 pb, que corresponden al SE-V del ADNr de *T. spiralis*. PM de 100 pb. Carril 1, control positivo de LM de *T. spiralis* porcina; Carril 2, control negativo ADN ratón no infectado; Carril 3, control negativo, ADN de caballo no infectado; Carril 4 control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo procedente del Estado de San Luís Potosí; Carril 21 y 22: sangre de caballos de Veracruz; Carril 23 y 24 LM de aislados de cerdo 1976 y 2000 de Zacatecas. Gel de agarosa al 2%.

Determinación de la variabilidad genética de *T. spiralis* en las muestras colectadas

De las muestras de ambos mataderos contemplados en este estudio, que resultaron positivas a *T. spiralis* y el material obtenido de los mataderos de TIF de Aguascalientes y San Vicente por Viveros y colaboradores (2001), se seleccionaron las que tienen un origen geográfico distinto. Por lo que se consideraron 14 muestras del rastro San Vicente procedentes del Estado de Veracruz; 4 muestras de caballos

originarios del Estado de San Luís Potosí de la planta TIF; además de 2 cepas del Estado de Zacatecas, que se identificaron como *T. spiralis*, obtenidas de cerdo en el año de 1976 y 2000 respectivamente.

La variabilidad genética en el SE-V del parásito en 20 de las muestras se analizó mediante el análisis del producto de amplificación del SE-V del ADNr del parásito utilizando los iniciadores oTsr 3 y oTsr 4. En la Figura 19, se observan los productos de amplificación con un tamaño de 290 pb en el control positivo porcino, así como, en las demás muestras. A este nivel no se observan diferencias en el tamaño del fragmento amplificado, ni artefactos generados durante la reacción de amplificación del SE-V, que pudieran observarse en el análisis de SSCP.

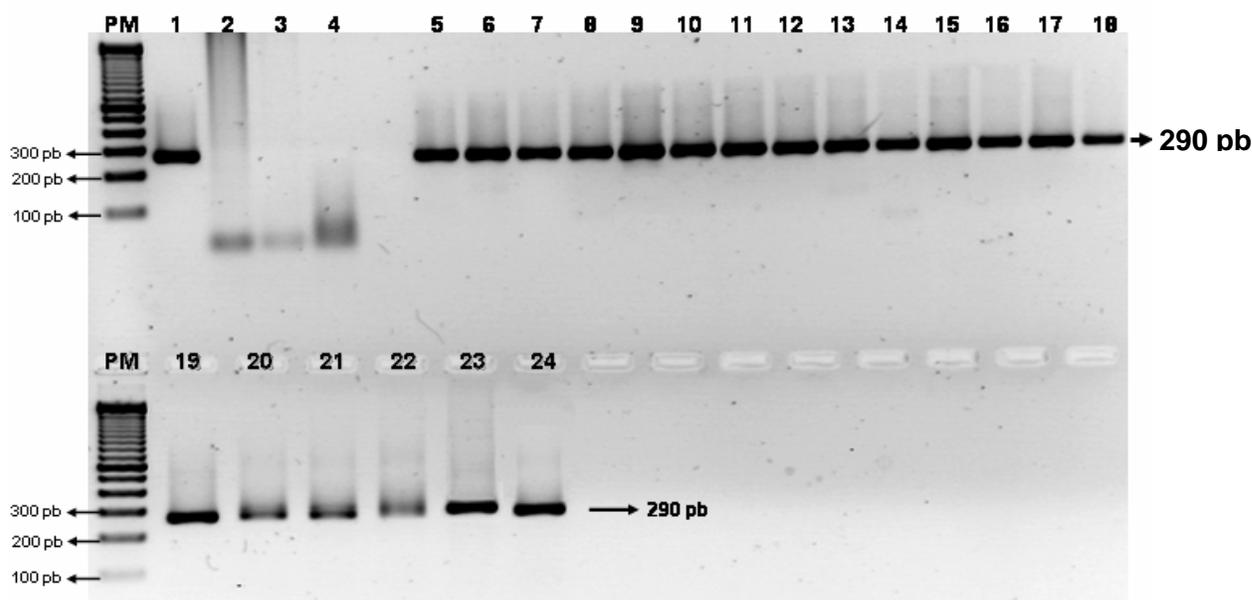


Figura 19. Productos de amplificación del SE-V del ADNr de *T. spiralis*. En todas las muestras se observa un fragmento de 290 pb, que no presentan diferencias de peso molecular. Marcadores de peso molecular (PM) 100 pb; Carril 1, control positivo LM *T. spiralis* porcino; Carril 2, control negativo ratón sin infectar; Carril 3, control negativo de caballo; Carril 4, control de reactivos; Carril 5, 6 y 7: caballos del Edo. de San Luís Potosí; Carril 8-19: caballos del Edo. de Veracruz; Carril 20, sangre de caballo procedente del Estado de San Luís Potosí; Carril 21 y 22, sangre de caballos del Estado de Veracruz; Carril 23 y 24 LM de asilados de cerdo 1976 y 2000 de Zacatecas. Gel de agarosa al 2%.

Los productos de PCR purificados fueron analizados por el método de SSCP para identificar diferencias en las secuencias mediante la formación de estructuras secundarias de ADN de cadena sencilla en los productos de PCR. El análisis de la migración de las cadenas sencillas y dobles del ADNr en el gel de poliarcilamida, mostró un patrón de seis bandas en el control porcino positivo de LM de *T. spiralis*, con un peso entre 150 y 450 pb. Las muestras de caballos procedentes de San Luis (carril 2-4) presentaron un patrón de migración diferente al control, la banda de 450 pb, está ausente en la muestra del carril 2 y en las muestras de los carriles 3 y 4, se observó la presencia de una banda entre 1200 y 1300 pb. En las muestras de caballos originarios del Edo. de Veracruz (carriles 5-16) se observaron diferencias en la secuencia del SE-V de la lsADNr del parásito con respecto a la muestra control, ya que sólo una de ellas presentó la banda de 450 pb (carril 7), en este grupo se observó que algunas muestras (carriles 5, 7, 9, 10, 12) no presentaban las bandas cercanas a los 300 pb, otra diferencia es la presencia de un producto de 600 pb en la muestra del carril 11. En el caso de las muestras de los carriles 17-19 no se presentaron las bandas entre 150 y 300 pb, esto puede ser debido a la cantidad de muestra utilizada en el experimento. En el caso de los aislados de *T. spiralis* obtenidos de cerdo, las diferencias en las secuencias del SE-V entre ellas son claramente notorias, ya que, la cepa obtenida en el 2000 (carril 21) presentó dos bandas de entre 250 y 300 pb, ausentes en la cepa colectada en 1976, ambas presentaron diferencias con el control positivo (Figura 20).

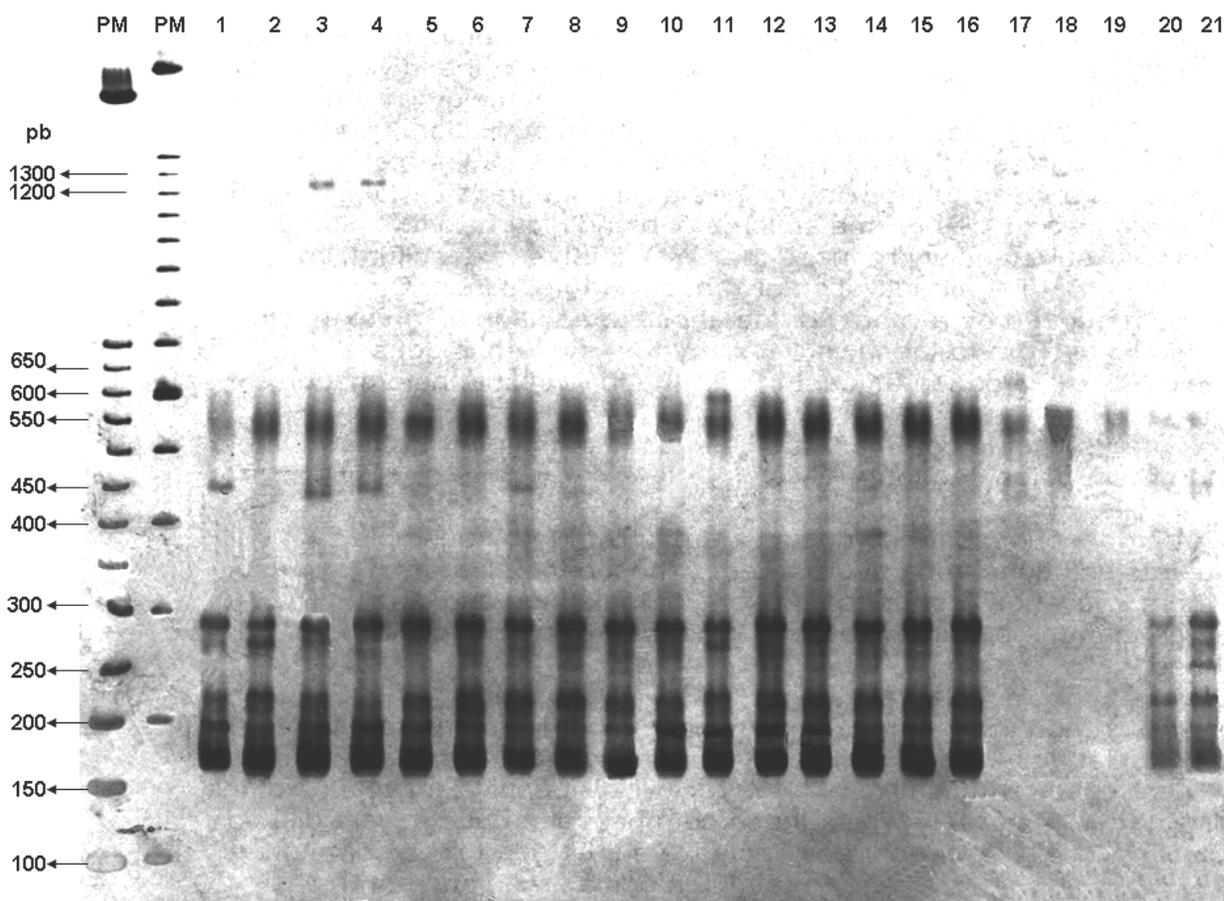


Figura 20. Análisis de SSCP de los amplificadores del SE-V del ADNr de *T. spiralis*. PM de 50 y 100 pb; Carril 1, control positivo de LM *T. spiralis*; Carril 2-4, muestras de caballos procedentes del Estado de San Luis Potosí; Carril 5-16, muestras de caballos del Edo de Veracruz; Carril 17, muestra positiva en sangre de caballo del Edo de San Luis; Carril 18 y 19, muestras positivas en sangre del Edo. de Veracruz; Carril 20 y 21 LM de *T. spiralis*, obtenidas de cerdo en 1976 y 2000 respectivamente, ambas procedentes de Zacatecas. En el control positivo se observa un patrón de seis bandas con un peso entre 150 y 450 pb, algunas de éstas no están presentes en todas las muestras, además de la presencia de otras bandas que se encuentran entre los 1200 y 1300 pb. Esto indica que existe una variación en la secuencia del SE-V de la subunidad mayor de ADNr del parásito. Gel de poliacrilamida al 7.5%, tinción de plata.

El análisis para la descripción de la diversidad genética sobre el gel de poliacrilamida mostró un perfil de 17 bandas únicas, considerando sólo las bandas que estaban claramente definidas y consistentes tomando como referencia el control porcino positivo (Tabla 5), se descartaron las muestras de sangre de los carriles 17-

19, ya que sólo se observó un barrido atribuido a la cantidad de muestra analizada. También se descartaron dos muestras procedentes del Estado de Veracruz (carril 15 y 16) dado que cuatro de ellas presentaron un perfil o número de bandas idéntico, como se puede observar en la Figura 20. Cada banda que presentó un tamaño definido se consideró como un carácter independiente e identificado como presente (1) o ausente (0).

Tabla 5. Matriz de variables cualitativas que indican la ausencia (0) y presencia (1) para el número de bandas únicas identificadas a partir del control porcino positivo y en las muestras analizadas.

Muestras analizadas																		
Bandas únicas	LM T.s	San Luís Potosí				Veracruz											Zacatecas	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	20	21
1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Para la comparación entre las muestras, este método de análisis de conteo asume que las bandas son aparentemente idénticas en tamaño y comparten identidad en las secuencias. La evaluación de las relaciones genéticas entre individuos se obtiene dividiendo el número de bandas ausentes entre la muestra analizada por el total de bandas únicas identificadas. La Tabla 6 indica la comparación genética entre el control positivo de *T. spiralis* con las muestras positivas y los aislados obtenidos de cerdo del Estado de Zacateca. Los valores son

un estimado de las diferencias detectadas en las secuencias del SE-V de la IsADNr entre cepas de la misma especie del parásito e indican que existe variabilidad genética intrapoblacional.

Tabla 6. Evaluación de las relaciones (comparación genética) entre (individuos), el control positivo de *T. spiralis* con las muestras positivas de caballos y los aislados obtenidos de cerdo del Estado de Zacateca, expresada en proporción. Los valores en 0 indican que no hay diferencias.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	20	21
1	0.0000															
2	0.0588	0.0000														
3	0.2353	0.1765	0.0000													
4	0.4118	0.3529	0.1765	0.0000												
5	0.1176	0.0588	0.1176	0.2941	0.0000											
6	0.2353	0.1765	0.2353	0.1765	0.1176	0.0000										
7	0.1765	0.1176	0.1765	0.2353	0.0588	0.1765	0.0000									
8	0.0588	0.0000	0.1765	0.3529	0.0588	0.1765	0.1176	0.0000								
9	0.1176	0.0588	0.1176	0.2941	0.0000	0.1176	0.0588	0.0588	0.0000							
10	0.1176	0.0588	0.1176	0.2941	0.0000	0.1176	0.0588	0.0588	0.0000	0.0000						
11	0.2353	0.1765	0.2353	0.4118	0.1176	0.2353	0.1765	0.1765	0.1176	0.1176	0.0000					
12	0.1176	0.0588	0.1176	0.2941	0.0000	0.1176	0.0588	0.0588	0.0000	0.0000	0.1176	0.0000				
13	0.2353	0.1765	0.2353	0.4118	0.1176	0.2353	0.1765	0.1765	0.1176	0.1176	0.2353	0.1176	0.0000			
14	0.2353	0.1765	0.2353	0.4118	0.1176	0.2353	0.1765	0.1765	0.1176	0.1176	0.2353	0.1176	0.0000	0.0000		
20	0.1176	0.0588	0.1176	0.2941	0.0000	0.1176	0.0588	0.0588	0.0000	0.0000	0.1176	0.0000	0.1176	0.1176	0.0000	
21	0.1176	0.0588	0.2353	0.4118	0.1176	0.2353	0.1176	0.0588	0.1176	0.1176	0.2353	0.1176	0.2353	0.2353	0.1176	0.0000

Para cada banda obtenida de las secuencias de los SE-V del control, los casos positivos para *T. spiralis* y los aislados de cerdo, en el análisis de SSCP's se determinó la tasa de polimorfismo (Pj) y la proporción de loci polimórficos. La Pj se calculó por observación directa respecto a si se cumple o no la siguiente definición: un gen es polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0.95 ó

0.99 (Tabla 7). Los valores obtenidos indican que 14 bandas son polimórficas y las 3 restantes son monomórficas. También se presenta el porcentaje de loci variables de la población analizada, en este estudio fue de 82%.

Tabla 7. Tasa de polimorfismo para cada una de las bandas obtenidas de los SE-V en las muestras analizadas por SSCP's y proporción de loci variables de la población.

Bandas Únicas	Frecuencia de alelos (q)	Tasa de Polimorfismo (P_j)	Proporción de loci polimórficos
		$P_j = q \leq 0.95$ ó $P_j = q \leq 0.99$	$P = n_p/n_{total}$
1	0.0625	Polimórfico	0.82352941
2	1.0000	Monomórfico	
3	0.2500	Polimórfico	
4	0.9375	Polimórfico	
5	1.0000	Monomórfico	
6	1.0000	Monomórfico	
7	0.0625	Polimórfico	
8	0.0625	Polimórfico	
9	0.0625	Polimórfico	
10	0.1250	Polimórfico	
11	0.1250	Polimórfico	
12	0.1250	Polimórfico	
13	0.0625	Polimórfico	
14	0.0625	Polimórfico	
15	0.1250	Polimórfico	
16	0.1250	Polimórfico	
17	0.0625	Polimórfico	

Discusión

La digestión artificial es uno de los métodos directos más utilizados, e incluso recomendado por la ICT y la OIE para el diagnóstico de la triquinelosis equina, que recomiendan analizar 10 g de carne. Sin embargo, su uso en este estudio no permitió la detección de LM del parásito en los diafragmas colectados de los caballos de los mataderos San Vicente y Río Frío, a pesar de haber analizado 40 g de tejido muscular. Existen otros estudios en los que se ha empleado este método parasitológico y tampoco ha sido posible detectar la presencia del parásito en muestras de tejido de caballos provenientes de los mataderos en nuestro país (Viveros y col., 2001). No obstante, esto no indica que la infección no este presente, ya que en 1994 en Francia, se reportaron 7 casos de triquinelosis humana, causados por el consumo de carne de caballo de origen mexicano (Boireau y col., 2000), procesada por los mataderos TIF que realizan la inspección para *Trichinella* mediante el método de digestión artificial y exportan carne de estos animales a países como Alemania, Japón y Francia (Yépez-Mulia y Ortega-Pierres, 1994; Arriaga-Díaz y col., 1996).

La sensibilidad de la digestión artificial depende de la cantidad y de la región muscular analizada (van Knapen, 2000). No obstante, sólo este método es aceptado para detectar la infección en caballos (Pozio y col., 1999; OIE ,2000), aunque es poco sensible. Por lo que se requiere analizar otras regiones de la canal como los músculos maseteros o lengua para un diagnóstico más confiable (Pozio y col., 1999), y además aplicar más de una prueba de diagnóstico, con la finalidad de evitar que ésta enfermedad se transmita a la población, ya que el consumo de carne de caballo es común en la población.

La baja sensibilidad de este método de diagnóstico en caballos puede ser atribuido a una infección con cargas parasitarias bajas, como refieren Yépez-Mulia y colaboradores (1999), en caballos de mataderos rurales del país. Las cargas

parasitarias bajas en infecciones naturales en caballos podrían estar relacionadas con la infectividad del parásito y/o a la respuesta inmune del hospedero, ya que Wakelin y Goyal (1996), mostraron que aislados de *Tichinella* de diferentes regiones geográficas difieren en su capacidad infectiva. Por otro lado, la respuesta inmune del hospedero, está asociada con la expresión de antígenos inmunodominantes del parásito y es un factor muy importante que determina la infectividad del parásito, ésta interacción se conoce como fenotipo compartido o fenotipo de acción (Minchella y col., 1994).

Una alternativa para el diagnóstico de la triquinelosis en animales, son los métodos moleculares, utilizados para amplificar secuencias específicas del ADN del parásito mediante PCR (Klassen y col., 1986; Dupouy-Camet y col., 1991; Dick y col., 1992; Caballero y Jiménez, 2001; Viveros y col., 2001; Gonzáles y col., 2002; Uribe y col., 2003; Trejo y col., 2004). El uso del PCR en músculo y sangre de ratones y caballos infectados experimentalmente han permitido detectar la presencia del parásito de manera sensible y específica (Dupouy-Camet y col., 1991; Soulé y col., 1994; Uparanukraw y Morakote, 1997; Caballero y Jiménez, 2001).

En este estudio se utilizaron dos tipos de PCR con la finalidad de evidenciar la presencia del parásito en muestras de diafragma de caballos destinados al matadero. En el PCR múltiplex, se conjuntaron cinco juegos de iniciadores (Tabla 3), para determinar la presencia del parásito e identificar la especie de *Trichinella* (Zarlenga y col., 1999; 2000) y en el PCR sencillo un par de iniciadores designados como pPRA, que se han empleado de manera amplia para la identificación de *T. spiralis* (Klassen y col., 1986; Dupouy-Camet y col., 1991; Dick y col., 1992; Caballero y Jiménez, 2001; Viveros y col., 2001; Gonzáles y col., 2002; Uribe y col., 2003; Trejo y col., 2004), la sensibilidad de este ensayo es de 2 ng de DNA que corresponden aproximadamente a 0.02 larvas, es decir menos de una LM (Dupouy-Camet y col., 1991). Viveros y colaboradores (2001) obtuvieron amplificadas utilizando 7 ng de ADN de LM de *T. spiralis* y en el análisis de ADN obtenido del tejido de caballos

infectados naturalmente (con 9 larvas por gramo), se pudo amplificar al ADN del parásito, utilizando 100 ng de ADN inicial (Viveros y col., 2001).

El análisis por PCR múltiplex de las muestras colectadas de diafragma de caballos del matadero San Vicente resultó negativo, indicando que el parásito no estaba presente. Del mismo modo, muestras de tejido determinadas como positivas para *T. spiralis* en un estudio previo empleando los iniciadores pPRA (Viveros y col., 2001), al ser analizadas por PCR múltiplex, también resultaron negativas. Sin embargo, en estudios anteriores realizados en este rastro (Arriaga y col., 1995; Yépez-Mulia y col., 1999; Uribe y col., 2003) se determinó la presencia del parásito (5%) por PCR empleando como marcador molecular la secuencia pPRA y en algunas ocasiones también fue posible obtener aislados de *T. spiralis* en muestras del mismo rastro (Arriaga y col., 1995; Uribe y col., 2003). Considerando lo anterior, se procedió a analizar las muestras de tejido colectadas en este estudio de ambos mataderos por PCR con los iniciadores pPRA. De este análisis se determinó que 22 y 11% de las muestras fueron positivas para el parásito en los mataderos "5 de Junio" y "Río Frío" respectivamente. Las muestras de tejido determinadas como positivas en un estudio previo, fueron confirmadas como positivas empleando la secuencia pPRA.

El PCR múltiplex descrito por Zarlenga y colaboradores, (1999; 2000) ha sido utilizado para identificar las secuencias de los ITS1, ITS2 y SE-V de las regiones repetidas del ADNr de cinco especies de *Trichinella*, tres genotipos diferentes de *T. pseudospiralis* y dos genotipos designados como T5 y T6. Cabe señalar que estos estudios se han realizado con el ADN de LM purificadas y no con tejido de animales infectados. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la búsqueda de los genes ribosomales del parásito empleando el PCR múltiplex presenta desventajas cuando se requiere analizar muestras de tejido muscular de caballos infectados, restando sensibilidad al ensayo. Esto puede ser causado por algunos factores, como una interacción entre iniciadores (iniciador-iniciador), o por el hecho de que el múltiplex tiene una concentración limitada de enzima y nucleótidos, y todos los

productos compiten en la mezcla de reacción (Henegariu y col., 1997). Otro factor determinante para los resultados obtenidos puede ser la baja concentración de ADN del parásito en el tejido analizado, debido a que se trata de muestras con carga parasitaria baja. Sin embargo, aún al aumentarse la cantidad de ADN analizado y de nucleótidos, no se obtuvo el producto de amplificación esperado.

Con los iniciadores pPRA se obtuvieron los fragmentos de amplificación esperados de 600 y 800pb en las muestras analizadas y dado que estos productos se consideran específicos para *T. spiralis*, se procedió al análisis de 15 de estas muestras, empleando los iniciadores oTsr 1 y 4 cercanos a la región terminal 5' y 3' respectivamente del SE-V del ADNr de *T. spiralis*, a partir de los cuales se obtiene un producto de amplificación de 173 pb. Estos iniciadores forman parte de la mezcla de oligonucleótidos empleada en el PCR múltiplex. Todas las muestras positivas con los pPRA, también fueron positivas con los iniciadores oTsr 1 y oTsr 4, confirmando la presencia del parásito en estas muestras, que de manera comparativa fueron negativas con el PCR múltiplex. Estos resultados confirman que el PCR múltiplex pierde su sensibilidad cuando se analizan muestras de músculo de caballos. Es probable que la pérdida de sensibilidad se deba a la interferencia de los otros iniciadores presentes en la mezcla (Henegariu y col., 1997).

El análisis por SSCP de los productos de PCR purificados, permitió identificar diferencias en las secuencias del SE-V mediante la formación de estructuras secundarias de ADN de cadena sencilla y dobles en los productos de PCR, que sometidos a condiciones de refrigeración, las moléculas de cadena sencilla adquieren una conformación en su estructura secundaria y terciaria. La conformación es altamente dependiente de la secuencia primaria (largo y composición de los nucleótidos). Por lo tanto, una mutación en una posición en particular a la largo de secuencia (estructura primaria) puede cambiar la conformación de las moléculas de ADN y alterar la movilidad durante la electroforesis en gel no desnaturizante (Gasser y col., 1998).

La asignación de variables cualitativas de presencia (1) o ausencia (0) en todas las muestras analizadas permitió identificar 17 bandas únicas. En la evaluación de las cadenas sencillas y dobles de los amplificadores del SE-V, el número de bandas por muestra varía de 4 a 7 (Figura 20). El patrón genético del SE-V del ADNr de *Trichinella* reportado por Gasser y colaboradores (2005), varía de 4 a 14 bandas (cadenas sencillas y dobles de ADN) según la especie y su distribución geográfica. En el presente estudio se observó que las poblaciones de *T. spiralis* muestran un perfil genético intraespecífico diferente, de acuerdo a su distribución geográfica y al tipo de hospedero. Las muestras procedentes del Estado de San Luís Potosí (carriles 2, 3 y 4) presentan variación en la secuencia, considerando que fueron obtenidas en el matadero a partir de un mismo lote; sin embargo, su procedencia dentro del Estado pudiera ser diferente. En las muestras de caballos originarios del Estado de Veracruz, también se observa variabilidad en las secuencias del SE-V del ADNr de *T. spiralis* desplegada en el análisis de SSCP (carril 5-16). Entre estas destacan las muestras en los carriles 7 y 11 (Figura 20), con la presencia de una banda de 400 y 600 pb respectivamente. También se puede observar que hay cuatro muestras (carril 13-16) que presentan un patrón de bandas idéntico, lamentablemente no se tiene información si proceden de la misma región en el Estado de Veracruz.

Si bien es cierto que el análisis de SSCP permite identificar el cambio de una sola base en la secuencia de nucleótidos del SE-V de la subunidad mayor del ADNr y establecer las diferencias genéticas del parásito, no es posible determinar con exactitud cuantas de esas bandas en los locus ADNr nuclear son alelos dominantes o recesivos, ni mucho menos indicar si son homocigotos u heterocigotos. Sin embargo, por el perfil de las bandas presentes, se determinó que existe heterogeneidad en las secuencias de los SE-V entre aislados. Esto demostrado no solo por el patrón y número de bandas presentes en el ensayo de SSCP, también por los análisis de Pj y P utilizados, que permitieron establecer que existe un grado de variabilidad genética dentro de las poblaciones de *T. spiralis*, relacionada con su distribución geográfica y con el tipo de hospedero al que afecta, considerando que un

gen es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia menor o igual a 0.95 ó 0.99. El límite de la frecuencia alelica, que se fija en 0.95 (ó 0.99) es arbitrario, sin embargo, permite identificar aquellos genes que presentan variación alelica (IPGRI y Cornell University, 2004; Rivas, 2001). Esto asume que 13 de las bandas identificadas en todas las muestras son alelos raros o polimórficas y las tres restantes son monomórficas en los SE-V de la IsADNr de estos parásitos. El valor P obtenido en este estudio fue de 82%, e indica que el polimorfismo es frecuente en los SE-V de los parásitos.

En este estudio, se observó variabilidad genética entre individuos de *T. spiralis* de una misma población, determinada por el análisis del SE-V del ADNr, no sólo por el origen geográfico, si no que también se asocia al tipo de hospedero, como se puede observar en los aislados de cerdo (carril 20 y 21, Figura 19), que presentan diferencias entre ellas en sus secuencias, como con las secuencias de las muestras positivas en caballos. Todas las muestras son genéticamente diferentes al control porcino positivo de *T. spiralis*. Zarlenga y colaboradores (1996), han postulado que el polimorfismo dentro del SE-V de la IsrDNA de *T. spiralis* puede ser originado por un desplazamiento asimétrico de los cromosomas homólogos en la etapa de zigoteno de la profase I en la meiosis, donde se realiza el entrecruzamiento y recombinación de los cromosomas.

Los locus de ADNr nuclear pueden ser utilizadas para analizar y comparar la composición genética de las poblaciones de *Trichinella*, ya que este tipo de estudios permitiría resolver la hipótesis actual con respecto a la relación sistemática de las especies dentro del género (Gasser y col., 2005).

Conclusiones

Con el método de digestión artificial no se identificó la presencia del parásito en las muestras de caballos, posiblemente debido a cargas parasitarias bajas.

En este estudio se demostró que la técnica de PCR múltiplex no es sensible para la detección del parásito a partir de músculos de caballos infectados naturalmente.

El ensayo de PCR utilizando a los iniciador pPRA es sensible y específico para identificar la presencia del parásito en músculos de caballos infectados naturalmente.

El análisis por SSCP de las secuencias del SE-V del ADNr de *T. spiralis*, demostró que existe variabilidad genética en las poblaciones del parásito presentes en un mismo hospedero (caballo) con diferente distribución geográfica, así como, en diferente hospedero (cerdo).

Perspectivas

Las muestras que presentaron diferencias genéticas requerirán ser secuenciadas para determinar los cambios que se presentan en la secuencia del SE-V, seguido de un análisis con herramientas bioinformáticas para determinar los cambios precisos en las secuencias del SE-V, que dan origen a la variabilidad genética observada.

En caballos infectados naturalmente es difícil obtener parásitos, probablemente se deba a una infección con cargas parasitarias bajas, por lo que, sería conveniente continuar este trabajo utilizando otras especies animales afectadas como el cerdo. En estos animales la infección se presenta con cargas parasitarias altas, que permitiría obtener parásitos del tejido muscular con seguridad, para re-analizar la variabilidad genética en las poblaciones de *Trichinella* en distintos hospederos, y correlacionarla con características biológicas como son el índice de capacidad reproductiva, la producción y tipo de antígenos del parásito y otras que puedan indicar la virulencia de las cepas de *Trichinella*.

Bibliografía

- Abad, S. A., Servin, A, L. A. 1989. Introducción al muestreo. Ed. Limusa, México pp: 61-69.
- Almaraz, M. G., Jaramillo, A. C., Nicoli, T. M. 1995. Identificación de especie animal como adulterante en chorizo, longaniza y carne para hamburguesa. *Veterinaria México*. 26: 139-140.
- Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Claude, D. J., Maillot, E., Savage-Houze, S., Charlet, F., Drucker, J., Moren, A. 1998. A multifocal outbreak of trichinellosis linked to horse meat imported from northe America to France in 1993. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*. 59: 615-619.
- Arriaga, D. C., Yépez, M. L., Viveros, N., Adame, L. A., Zarlenga, D. S., Lichtenfels, J. R., Benítez, E., Ortega-Pierres, M. G. 1995. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larve in naturally infected horse. *Journal of Parasitology*. 81: 781-783.
- Arriaga-Díaz, C., Yépez-Mulia, L., Ortega-Pierres, M. G. 1996. Actualidades sobre la triquinelosis equina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 38: 139-150.
- Álvarez-Chacón, R., Riega-Carnero, R. E., García-Rosales, J. J., Wong-Chío, M., Cob-Sosa, C. E. 1992. Triquinosis en el niño. Informe de 8 casos. *Boletín Medico, Hospital Infantil de México, Federico Gómez*. 49: 286-290.
- Bolas-Fernández, F., Wakelin, D. 1992. Immunization against geographical isolates of *Trichinella spiralis* in mice. *International Journal for Parasitology*. 22: 773-781.
- Bolas-Fernández, F. 2003. Biological variation in *Trichinella* species and genotypes. *Journal of Helminthology*. 77: 111-118.
- Bandi, C., La Rosa, G., Comincini, S., Damiani, G., Pozio, E. 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*. 107: 419-424.
- Boireau, P., Vallee, I., Roman, T., Perret, C., Mingyuan, L., Gamble, H. R., Gajadhar, A. 2000. *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Veterinary Parasitology*. 93: 309-320.

- Caballero, G. M. L., Jiménez, C. E. 2001. Early detection of *Trichinella spiralis* infection by polymerase Chain reaction in blood samples of experimentally infected mice. *Parasite*. 8: S229-S231.
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, M. P. 1994. Staining nucleic acids with silver: An alternative to radioisotopic and fluorescent labeling. *Promega Notes Magazine*. 45: 13.
- Cordero del Campillo, M., Rojo, V. F. A., Martínez, F. A. R., Sánchez, A. C., Hernández, R. S., López-Cózar, N. J., Diez, B. P., Quiroz, R. H., Carvalho, V. M. 1999. *Parasitología Veterinaria*. Mc Graw-Hill Interamericana, México. pp: 496-506.
- Chilton, N. B., Florence, H. C., Gasser. B. R. 2003. First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*. 17: 33-39.
- De la Rosa, J. L., Gómez, A. 2004. "*Trichinella* y triquinosis". Ed. Mc Graw Hill. México.
- De Haro, A. L., Salazar, P. M., Cabrera, B. M., 1995. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. Ed. Méndez editores, 2ª Ed. pp. 115-173.
- Dea-Ayuela, A. M., Bolas-Fernández, F. 1999. *Trichinella* antigens: a review. *Veterinary Research*. 30: 559-571.
- de Vos, T., Klassen, R. G., Dick, A. T. 1988. Sequence analysis of a 1.6 kb repetitive element from a porcine isolate of *Trichinella spiralis*. *Nucleic Acids Research*. 16: 3114.
- Despommier, D., Gwadz, W. R., Hotez, J. P. 1994. *Parasitic Disease*. Springer Verlag. 3Th edition. New York. pp. 32-40.
- Despommier, D., Gwadz, W. R., Hotez, J. P., Knirsch, A. Ch. 2005. *Parasitic Diseases: Chapter V, The Nematodes: Trichinella spiralis*. Apple Trees Production, L.L.C. 5Th edition. New York. pp: 135-142.

- Dick, T. A., Mingchuan, L., de Vos, T., Ma, K. 1992. The use of the polimerase chain reaction to indentify porcine isolates of *Trichinella*. *Journal of Parasitology*. 78: 145-148.
- Dupouy-Camet, J., Soulé, C., Guillou, J. P., Rouer, E., Souza, S. L., Ancelle, T., Benarous, R. 1991. Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitology Research*. 77: 180-182.
- Dupouy-Camet, J., Soulé, C., Ancelle, T. 1994. Recent news on trichinellosis: another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite*. 1: 99-105.
- Dupouy-Camet, J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 93: 191-200.
- Garate, T., Albarrán, E., Bolsa-Fernández, F., Martínez-Fernández, A. R., Parkhouse, R. M. E. 1991. DNA polymorphisms within Spanish *Trichinella* isolates. *Parasitology Research*. 7: 602-605.
- Gamble, H. R., Bessonov, A. S., Cuperlovic, K., Gajadhar, A. A., van Knapen, F., Noeckler, K., Schenone, H., Zhu, X. Q. 2000. Recommendations on methods for control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology*. 93: 393-408.
- Gasser, B. R., Zhu, Q. X., Monti, R. J., Dou, L., Cai, X., Pozio, E. 1998. PCR-SSCP of rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. *Molecular and Cellular Probes*. 12: 27-34.
- Gasser, B. R., Hu, M., Abs EL-Osta, G. Y., Zarlenga, D. S., Pozio, E. 2004. Non-isotopic single-strand conformation polymorphism analysis of sequence variability in ribosomal DNA expansion segments within the genus *Trichinella* (Nematoda: Adenophorea). *Electrophoresis*. 25: 3357-3364.
- Gasser, B. R., Hu, M., Abs EL-Osta, G. Y., Zarlenga, D, S., Pozio, E. 2005. Genetic analysis of *Trichinella* populations by 'cold' single-strand conformation polymorphism analysis. *Veterinary Parasitology*. 132: 23-26.

- Gajadhar, A. A., Gamble, H. R. 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichiella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology*. 93: 183-189.
- González, L. E., Aguilar, C. A. E., Astigarraga, Z. M., Yépez, M. L. 2002. Evaluación del uso potencial del PCR en el diagnóstico temprano de triquinelosis equina. Tesis de Licenciatura. Licenciatura en Química Farmacéutica y Biología. Universidad Autónoma de México. México, D. F.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. 1997. Múltiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*. 23: 504-511.
- IPGRI y Cornell University. 2004. Análisis de diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares; Módulo de aprendizaje; Medidas de la diversidad genética. International Plant Genetic Resources Institute. Disponible en: <http://www.biodiversityinternational.org>
- Jiménez, C. E., Caballero, G. M. L., Campos, V. G., Cazares, D. V., Crisóstomo, V. M. P., Eligio, G. L. 2004. Manual de técnicas de biología molecular básica. Ed. Prado, México. pp1-6.
- Klassen, G. R., Thiesen, J. P., Dick, T. A. 1986. Strain-specific 1.7 kilobase repetitive deoxyribonucleic acid sequence family in *Trichinella spiralis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 21: 227-233.
- Kwon, H. S., Chung M. S., JOO, K. H., 2001. PCR-RFLP patterns of four isolates of *Trichinella* for rDNA ITS1 region. *The Korean Journal of Parasitology*. 39: 43-48.
- Kapel, C. M. O. 2000. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Veterinary Parasitology*. 93: 263-278.
- Lloyd, J. R. 2000. Triquinelosis: Cátedra de Invertebrados. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires, Argentina. Disponible en <http://www.uncoma.edu.ar>
- Lamonthe, A. R., García, L. 1998. Helmintiasis del hombre en México. AGT Editores. México, D.F. pp: 74.

- Martínez-Pantaleón, O. B., Viguera-Rendon, A., Carvajal-Gutiérrez, A. M., Flores-Pérez, A., Abraham-Jalil, A. 1986. Trichinosis: Boletín Médico, Hospital Infantil de México. 43: 181-183.
- Maroli, M., Pozio, E. 2000. Influence of Temperature on the survival and infectivity of *Trichinella spiralis* larvae in *Sarcophaga argyrostoma* (Diptera, Sarcophagidae) maggots. Journal of Parasitology. 86: 633-634.
- Meslin, X. F., Stohr, K., Heymann, D. 2000. Public health implications of emerging zoonoses. Rev. sci. Off. Int. Epiz. 19: 310-317.
- Minchella, D. J., Eddings, A. R., Neel, S. T. 1994. Genetic, phenotypic and behavioral variation in North American sylvatic isolates of *Trichinella*. Journal of Parasitology. 80: 696-704.
- Monrroy, H., Flores-Trujillo, M., Benítez, E., Arriaga, C. 2000. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. Parasite. 8:S249-S251.
- Murrell, K. D., Lichtenfels, R. J., Zarlenga, D. S., Pozio, E. 2000. The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. Veterinary Parasitology. 93: 293-307.
- Murrell, K. D., Pozio, E. 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. International Journal of Parasitology. 30: 1339-1349.
- Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, E., Takahashi, Y. 1999. Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. International Journal for Parasitology. 29: 1113-1120.
- Owen, R. 1835. Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of the human body. Transactions of the Zoological Society of London. 1: 315-323.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 86:2766-2770.

- Ortega-Pierres, M. G., Arriaga, C., Yépez-Mulia, L. 2000. Epydemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology*. 93: 201-225.
- Office International des Epizooties (OIE). 2000. Trinchinellosis en: *Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines. Part 2, Section 2.2, Chapter 2.2.9.* Disponible:
http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/ancien_manuel/a_00046.htm
- Office International des Epizooties (OIE). 2006. Organización Mundial de Sanidad Animal: Lista de enfermedades de declaración obligatoria. Disponible en: http://www.oie.int/esp/maladies/es_oldclassification.htm. Situación zoonositaria mundial, disponible en: http://www.oie.int/hs2/ci_maladie.asp?ord=1. Situación zoonositaria en México disponible http://www.oie.int/hs2/sit_mald_cont.asp?c_mald=80&c_cont=6
- OMS, Ginebra. 2007. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentro/news/releases/2007/pr19/es>. Consultado el 20 septiembre de 2007.
- Pinheiro, A. N., Moura, P. R., Monteiro, E., Villa, L. L. 1999. Detection of point mutations by non-isotopic single strand conformation polymorphism. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32: 55-58.
- Pozio, E., Giuseppe, L. R., Rossi, P., Murrell, D. 1992. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology*. 78: 647-653.
- Pozio, E., Tamburrini, A., Sacchi, L., Gómez, M. M. A., Corona, S., Goffredo, E., La Rosa, G. 1997. Detection of *Trichinella spiralis* in Horse during routine examination in Italy. *International Journal of Parasitology*. 27: 1613-1621.
- Pozio, E., Paterlini, F., Pedarra, C., Sacchi, L., Bugarini, R., Goffredo, E., Boni, P. 1999. Predilection sites of *Trichinella spiralis* larve in naturally infected horse. *Journal of Helminthology*. 73: 233-237.

- Pozio, E., Tamburrini, A., La Rosa, G. 2001. Horse Trichinellosis, an unresolved puzzle. *Parasite*. 8: S263-S265.
- Pozio, E. 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary Parasitology*. 98:133-148.
- Pozio, E., La Rosa, G. 2003. *Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*. Edited by: Sanches, K., Frey, J., © Humana Press Inc., Totowa, NJ. Vol, 216. pp: 299-309.
- Pozio, E., Foggin, M. C., Marucci, G., La Rosa, G., Sacchi, L., Corona, S., Rossi, P., Mukaratirwa, S. 2002. *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *International Journal for Parasitology*. 32: 1787-1799.
- Quiroz, R. H. 1999. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. Ed. Uteha. México pp: 534-538.
- Rivas, M. 2001. Modo de reproducción y estructura genética de poblaciones de *Bromus Auleticus* Trinius Ex - Nees (*Poaceae*). II: Variación isoenzimática. *Agrociencias*. Vol. V: 32-40.
- Ribicich, M. M. 2005. Fundamentos e importancia de la utilización del test de ELISA para el diagnóstico de *Trichinella* en cerdos de Argentina. FORO 2007. RED DE HELMINTOLOGÍA PARA AMÉRICA LATINA y EL CARIBE, **FAO**. Disponible en: <http://cni.inta.gov.ar/helminto/pdf%20Triquinosis/FUNDAMENTOS%20E%20IMPORTANCIA%20DE%20LA%20UTILIZACI%20C3%93N%20DEL%20TEST%20DE%20ELISA%20PARA%20EL%20%20%20DIAGN%20C3%93STICO%20DE%20TRICHINELLOSIS%20EN%20CERDOS%20DE%20ARGENTINA.pdf>
- Ribicich, M. M., Gamble, H. R., Rosa, A., Bolpe, J., Franco, A. 2005. Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet Parasitol*. 13:137-42.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE). *Epidemiología, Sistema Único de Información*. Secretaria de Salud. Num. 2 Vol. 20. Semana 2. Del 5 al 11 de enero 2003.
- Soulé, C., Guillou, J. P., Dupouy-Camet, J., Vallet, C., Pozio, E. 1993. Differentiation

- of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction. Parasitology Research. 79: 461-465.
- Soulé, C., Guilou, J. P., Vallet, C., Perret, C., Calamel, M. 1994. *Trichinella spiralis* larvae detected by PCR in the blood of an experimentally infected horse. En: Campbell, W. C., Pozio, E., Bruschi, F. Ed. Trichinosis: Proceedings Eighth International Conference on Trichinellosis. Instituto Superiore di Sanita Press Roma, Italia, 09/07/93 to 09/10/93. pp. 101-104.
- Sofronic, M. L., Pozio, E., Patrascu, I. V., Skerovic, N., Gomez, M. M. A., Gamble, H. R. 2000. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. Parasite. 8:S260-S262.
- Takahashi, Y., Mingyuan, L., Waikagul, J. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. Veterinary Parasitology. 93: 227-239.
- Touratier, L. 2001. A challenge of veterinary public health in the European Union: Human Trichinellosis due to horse meat consumption. Parasite. 8: S252-S256.
- Trejo, H. E., Gay, J. F. R., Jiménez, C. E. 2004. Detección de la presencia del parásito *Trichinella spp.* en tejido muscular y sangre de caballos procedentes del rastro Ángel García Peralta, Río Frío Estado de México. Tesis de Licenciatura. México: CBS, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.
- Trichinella, disponible en: <http://www.trichinella.org/biology.htm>. Modificado de: Villella, J. B., 1970. Life cycle and morphology, in: *Trichinosis in Man and Animals* (S.E. Gould, ed.), Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, pp. 19-60. Copyright© 2003 www.Trichinella.org
- UNAM. 2002. Parasitología: fascículo IV: Guión 2: Generalidades del parasitismo: Manuales departamentales, Programa académico de la asignatura de Microbiología y Parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CU. p: 25-26.

- Uribe, G. G., Gay, J. F. R., Jiménez, C. E. 2003. Estudio epidemiológico para determinar la presencia de *Trichinella spp.* en sangre y músculos de equinos que se sacrifican en el matadero 5 de junio de San Vicente Chicoloapan, Estado de México. Tesis de Licenciatura. México: CBS, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Lic. Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.
- Uparanukraw, P., Morakote, N. 1997. Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. *Parasitology Research*. 83: 52-56.
- van Knapen, F. 2000. Control of trichinellosis by inspection and farm management practices. *Veterinary Parasitology*. 93: 385-392.
- Viveros, N., Arriaga, C., Banda, V., Ortega-Pierres, M. G., Yépez- Mulia, L. 2001. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horse by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite*. 8: S257-S259.
- Wakelin, D., Goyal, P. K. 1996. *Trichinella* isolates: parasite variability and host responses. *International Journal for Parasitology*. 26: 471-479.
- William, M. S., Margo, J. P., Kocan, A. A. 2001. Parasitic diseases of wild mammals. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data. Iowa State University Press, United States of America. pp: 380-396.
- Wu, Z., Nagano, I., Takahashi, Y. 1998. The detection of *Trichinella* with polymerase chain reaction (PCR) primers constructed using sequences of random amplified polymorphic DNA (RAPD) or sequences of complementary DNA encoding excretory-secretory (E-S) glycoproteins. *Parasitology*. 117: 173-183.
- Wu, Z., Nagano, I., Pozio, E., Takahashi, Y. 1999. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology*. 118: 211-218.
- Yao, C., Prestwood, K. A., McGraw, A. R. 1997. *Trichinella spiralis* (T₁) and *Trichinella* T₅: a comparison using animal infectivity and molecular biology techniques. *Journal of Parasitology*. 83: 88-95.
- Yépez-Muliá, L., Ortega-Pierres, M. G. 1994. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la Triquinelosis. *Revista Latino Americana de Microbiología*. 36 127-138.

- Yépez-Muliá, L., Arriaga, C., Viveros, N., Adame, A., Benítez, E., Ortega-Pierres, M. G. 1999. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and Western blot analysis. *Veterinary Parasitology*. 81: 57-68.
- Zarlenga, D. S., Al-Yaman, F., Minchella, D. J., La Rosa, G. 1991. A repetitive DNA probes specific for a North American sylvatic genotype of *Trichinella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 48: 131-138.
- Zarlenga, D. S., Dame, B. J. 1992. The identification and characterization of a break within the large subunit ribosomal RNA of *Trichinella spiralis*: comparison of gap sequences within the genus. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 51: 281-290.
- Zarlenga, D. S., Aschenbrenner, A. R., Lichtenfels, R. J. 1996. Variations in microsatellite sequences provide evidence for population differences and multiple ribosomal gene repeats within *Trichinella pseudospiralis*. *Journal of Parasitology*. 82: 534-538.
- Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, A., Kapel, C. M. O. 1999. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*. 29: 1859-1867.
- Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, A., Kapel, C. M. O. 2001. A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*. *Parasite*. 8: S24-S26.

ANEXO I

Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos salinos pH 7.2 (PBS 1X).

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	0.36 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2PO_4)	1.05 g
Cloruro de sodio (NaCl)	8.77 g

Solución para la digestión artificial

Pepsina 600-800 U/mg proteína (SIGMA No. Cat. P712 - 500G)	1 g
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL
Agua c.b.p.	100 mL

Amortiguador de lisis de ADN pH 8

EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$)	0.1 M
Cloruro de sodio (NaCl)	8.76 g
Agua c.b.p.	1000 mL

SDS al 10% (p/v)

SDS (dodecilsulfato de sodio)	10 g
Agua c.b.p.	100 mL

Proteinasa K

Disolver la enzima con agua inyectable a una concentración de 1 mg/ml. Partiendo de la ecuación $C_1V_1 = C_2V_2$ se realizan los cálculos para determinar los volúmenes de SDS y Proteinasa K que se requieren para llegar a las concentraciones finales durante la lisis.

Fenol estabilizado a pH 8

Se utilizo UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol, grado Biología Molecular (Invitrogen, life Technologies. Cat. No.15513-047)

Fenol-Cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1)

Fenol	25 mL
-------	-------

Cloroformo	24 mL
Alcohol isoamilico	1 mL
Cloroformo-Alcohol isoamilico (24:1)	
Cloroformo	24 mL
Alcohol isoamilico	1 mL

Acetato de sodio 3 M, pH 8

Se pesan 246.09 gr de acetato de sodio y se disuelve en 1 litro de agua.

Etanol al 95 % (v/v).

Etanol al 80 % (v/v).

Reactivos para PCR múltiplex

Enzima Platinum[®] Taq DNA Polimerasa 5 U/ μ L, amortiguador de mantenimiento (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; NaCl 40 mM; Fosfato de sodio 2 mM; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM; estabilizada en 50% de glicerol (v/v).

Amortiguador PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4; KCl 500 mM).

MgCl₂ 50 mM.

Mezcla de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM, grado PCR (Invitrogen, life technologies. No. Cat. 18427-088).

Iniciadores I, II, III, IV, V 10 pmol/ μ L.

ADN genómico 500 ng.

Reactivos para PCR sencillo

Enzima Taq DNA Polimerasa en buffer B (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; KCl 100 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; glicerol 50%; 0.5% Tween[®]; 0.5% Nonidet[®]-P40), Promega. No. Cat. M1661.

Amortiguador PCR 10X de la enzima (Tris-HCl 10 mM pH 9.0; KCl 50 mM; 0.1% Triton[®]X-100).

MgCl₂ 25 mM.

Mezcla de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM grado PCR (Invitrogen, life technologies. No. Cat. 18427-088).

Iniciadores pPRA1 y pPRA3, 10 pmol/ μ L.

ADN blanco 500 ng.

Reactivos para SSCP

Enzima Platinum[®] Taq DNA Polimerasa 5 U/ μ L, amortiguador de mantenimiento (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0; NaCl 40 mM; Fosfato de sodio 2 mM; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM; estabilizada en 50% de glicerol (v/v).

Amortiguador PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4; KCl 500 mM).

MgCl₂ 50 mM

Mezcla de dNTP's (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM, grado PCR (Invitrogen, life technologies. No. Cat. 18427-088).

Iniciadores oTsr3, oTsr4, NC 28-26 y NC 28-25R, 10 pmol/ μ L.

ADN blanco 500 ng.

Amortiguador de corrimiento electroforético (TBE 5X)

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M, pH 8	20 mL
Agua c.b.p.	1000 mL

Bromuro de Etidio 0.5 mg/mL

Se agregan 5 μ L de un stock de Bromuro de etidio a 10 mg/mL por cada 10 mL de amortiguador con agarosa para que la concentración final sea de 0.5 μ g/mL.

Agarosa

Se utiliza grado Biología Molecular.

Amortiguador de carga (SSCP)

Hidróxido de sodio (NaOH)	10 mM
EDTA	20 mM
Formamida	95 %
Azul de bromofenol	0.05 %
Xylen cianol	0.05%

Gel de Archilamida 7.5 %

Archilamida al 30 %	8.75 mL
Agua destilada	17.255 mL

TBE 5X	7 mL
Glicerol 5 %	1.75 mL
Persulfato de amonio 10 %	0.245 mL
Desgasificar 10 minutos	
TEMED	12.25 μ L
Reactivos para la Tinción con Nitrato de Plata	
Solución de fijación:	
Ácido acético	7.5 %
Solución de impregnación con Nitrato de Plata:	
AgNO ₃	1.5 g/L
Formaldehído	0.056 %
Solución reveladora:	
Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃)	30 g/L
Formaldehído	0.056 %
Tiosulfato de sodio	400 μ g/L

ANEXO II

Esquema de infección en ratas *Sprague Dawley*

Se utilizaron ratas *Sprague Dawley* macho, entre 250 y 300 g de peso. Los animales se infectaron por vía intragástrica con 5,000 LM de la cepa de referencia *T. spiralis*, MSUS/MEX/91/CM-91, resuspendidas en bactoagar al 0.2%, utilizando una cánula de 22G X 850 mm. Se mantuvieron por 28 días para permitir que la infección se generalizara y se sacrificaron para obtener LM por digestión artificial.

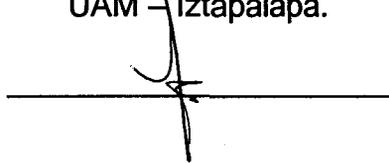
“Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: **Análisis de la variabilidad genética en cepas de *Trichinella spiralis* obtenidas de caballos de dos regiones geográficas de México**, con fecha 26 de octubre del 2007”.

JURADO DE EXAMEN

Presidente:

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Titular C, Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM – Iztapalapa.



Secretario:

M en S. P. Francisco Ramón Gay Jiménez

Profesor Titular C, Departamento de Producción Agrícola y Animal
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
UAM – Xochimilco.



Vocal:

M en B. E. Guillermina Campos Valdéz

Investigador Asociado A, Laboratorio de Investigación en Parasitología,
Hospital Infantil de México, Federico Gómez, SS.

