

Detección de *Trichinella Spiralis* en Rata Doméstica del Basurero Municipal de Zacatecas

Dra. María Alejandra Moreno García: Unidad Académica de Biología Experimental Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia e mail: amoreno_29@hotmail.com | **M. en C. Jesús Rivas Gutiérrez:** Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia | **M.V.Z. Vicente Berumen De La Torre:** Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia | **M. en C. J. Jesús Muñoz Escobedo:** Unidad Académica de Odontología. Universidad Autónoma de Zacatecas. Apartado postal 12 Guadalupe Zacatecas, México. CP 98600

REDVET: 2007, Vol. VIII Nº 5

Recibido: 18 Marzo 2007 / Referencia: 050713_REDVET / Aceptado: 30 Abril 2007 / Publicado: 01 mayo 2007

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050507/050713.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

Trichinellosis zoonosis endémica reportada en el estado de Zacatecas desde 1976, siendo su transmisor al humano el cerdo por el consumo de productos carnicos deficientemente cocidos. En los últimos 10 años en todo el mundo desafortunadamente se ha presentado un aumento de esta parasitosis, de la cual solo se hace el diagnóstico cuando hay brotes o es evidente que el parásito este situado en músculo estriado y hasta el momento no hay un tratamiento definitivo. Siendo el trasmisor al cerdo la rata.

Objetivo: Detección de *Trichinella spiralis* en rata domestica del basurero Municipal de Zacatecas.

Material y Métodos: Detección de *Trichinella spiralis* en uno de los

huéspedes que permiten su permanencia como Zoonosis, análisis de 100 diafragmas de ratas domesticas y suero del basurero municipal de Zacatecas. Diagnóstico por técnicas directas de compresión y digestión artificial e indirectas por Micro inmunodifusión (MIDD), Inmunoelctrotrasferencia (IET), reproducción del modelo experimental en rata Long Evans.

Resultados: Se detecto *Trichinella spiralis* en 3 diafragmas de ratas domesticas por técnica directa de compresión y digestión artificial, y por técnicas indirectas de MIDD y IET.

Conclusiones: Se detecto *Trichinella spiralis* en rata domestica, huésped que participa en la permanencia de esta parasitosis como zoonosis.

Palabras claves: Rata doméstica | *Trichinella spiralis* |

Summary

Trichinellosis endemic zoonosis, reported in state of Zacatecas since 1976, the transmissor to the human is the pig, for the pork products, that are deficient cook. In the last 10 years in all the world unfortunately it had present an increase of this parasitosis, wich single make the diagnostic even exist breakout, or is evident that the parasite is situating in estriado muscle, even this moment don't exist a definitive treatment.

And the transmissor is the pig to the rat.

Objective: *Trichinella spiralis* detection in domestic rat from Zacatecas Municipal dump.

Methods and material: In one of the residents, which allow it permanence like zoonosis, Analysis of 100 diaphragms of

domestic rats of municipal dump. Diagnostics for direct techniques of compression and artificial digestion and indirects for microinmunodifusion (MIDD), and Inmunoelctrotransference (IET), reproduction for of the experimental model in Long Evan rats.

Results: We detect *Trichinella spiralis* in 3 diaphragms of domestic rats, for direct techniques of compression and artificial digestion, and for indirect techniques of MIDD and IET.

Conclusions: We detect *Trichinella spiralis* in domestic rat, resident that participate in the permanence of this parasitosis like zoonosis.

Key words: domestic rat | *Trichinella spiralis* |

ANTECEDENTES

Los principales huéspedes domésticos de la *T. spiralis* son la rata, el cerdo, el perro, el gato y el hombre. El hombre adquiere la infección a través de la ingestión de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida, con larvas infectantes de (L.I) de *T.spiralis* (1).

En esta enfermedad se involucra los roedores del género *Rattus* en el ciclo biológico del mantenimiento y la transmisión de la Trichinellosis.

La asociación de los roedores con la epidemiología de diferentes patógenos, de los cuales actúan como reservorios, se ve favorecida porque constituyen el grupo más numeroso dentro de los mamíferos y por su capacidad de colonizar exitosamente todos los hábitat utilizados por el hombre.

Su potencial reproductivo les permite alcanzar densidades altas en cortos lapsos. En la mayoría de las especies cada hembra adulta puede producir hasta cuatro camadas, con cuatro crías en promedio por camada. El ciclo reproductivo es generalmente estacional con receso invernal, su duración puede variar según las condiciones climáticas y la disponibilidad de recursos, que también ocasionan cambios en la supervivencia. Esto genera un patrón estacional de variación en las abundancias poblacionales, pudiendo variar sus densidades entre 5 y 20 veces desde su mínimo valor en primavera hasta su máximo en otoño (2).

Diagnostico de Trichinellosis.

Los métodos de detección en dos grandes grupos: Técnicas Directas: Compresión, Digestión Artificial y PCR y Técnicas Indirectas: Microinmunodifusión (MIDD), Dot-ELISA, Inmunolectrotransferencia (IET) (3,4,5).

OBJETIVO

Detección de *Trichinella spiralis* en rata doméstica del basurero Municipal de Zacatecas, México.

MATERIAL Y MÉTODOS

GRUPO DE ESTUDIO

Se obtuvieron 100 ratas del basurero municipal de Zacatecas (Fotografía 1), de las cuales se obtuvo suero para detección de anticuerpos anti-*T.spiralis* por técnica indirecta de microinmunodifusión e inmunolectroforesis.



Fotografía 1.- Rata doméstica del basurero Municipal de Zacatecas México.

TÉCNICAS DIRECTAS.

TÉCNICA DE COMPRESIÓN.

Se sacrificaron las ratas del basurero municipal usando vapores de halotan, obteniéndose por disección toda la carne, se observó por compresión en placa, 0.5 g de los tejidos de diafragma, macetero, lengua, intercostales y pierna, presionando cada uno entre dos laminillas de vidrio, verificando la presencia de LI al microscopio óptico con el objetivo 10X (4).

Los tejidos se sometieron a técnica directa de digestión artificial, para aislar LI de *Trichinella spiralis*.

Los tejidos positivos se utilizaran para la reproducción del ciclo biológico de *T. spiralis*.



A

B

Fotografía 2.- Técnica directa de digestión artificial: A.- Embudo de separación conteniendo tejido infectado con *T. spiralis*, B.- Larvas Infeccantes de *T. spiralis*.

METODOLOGÍA

La fuente de antígeno fue de LI de *T. spiralis* para las diferentes pruebas realizadas en el presente estudio fue a partir de la cepa que se ha seguido conservando en diferentes modelos experimentales en el Bioterio de la Unidad Académica de Biología Experimental, desde el primer brote de Trichinellosis reportado en el Estado de Zacatecas, en Laguna del Carretero municipio de Villanueva en 1976. Los animales utilizados para experimentación fueron proporcionados por el Bioterio de la misma institución perteneciente a la Universidad Autónoma de Zacatecas México.

TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL, PARA OBTENCIÓN DE LI DE

T. spiralis

El proceso se llevó a cabo a 37° C por 24 horas según el método descrito por Herrera *et al* 1986, donde se colocan 30 g de tejido infectado triturado, en un tamiz de tul, en forma de saco; suspendido en una solución al 0.03 % de pepsina (10,000 U) y HCl al 37 % (0.2M) en un litro de agua destilada en un embudo de separación; transcurridas las 24 horas se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo de separación (Fotografía 2) (6).

OBTENCIÓN DEL ANTIGENO SOLUBLE TOTAL DE *T. spiralis*

Con la obtención de las LI de *T. spiralis* se sometieron a varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasaron con acetona absoluta a evaporación y se mantuvieron en PBS, a continuación se procedió a sonicar con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI de *T. spiralis*, se centrifugó a 3500 rpm por 1.30 horas; el sobrenadante contiene el antígeno soluble total (AST) mismo que se usó como antígeno soluble total de *T. spiralis* para las diferentes pruebas en los sueros problema (6).

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

Se obtuvo una curva estándar usando Albúmina Sérica Bovina, según la metodología de Bradford (7), ajustando la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 610 nm mediante azul de Coomassie al 0.06 % preparado en HCl al 2.2 %. Interpolando el valor de la densidad óptica del antígeno, a la de la curva estándar de albúmina, se conoció el valor de la concentración de proteínas contenidas en los dos tipos de antígeno.

CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO EN GELES DE POLIACRILAMIDA (EGPA) DEL ANTIGENO SOLUBLE TOTAL DE *T. spiralis*

Se usaron geles de 8 X 10 cm., preparados con dodesil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras según lo propuesto por Laemmli (8) con una concentración al 12% del gel separador el cual se preparó como sigue: 3.84 ml. de Acrilamida-BisAcrilamida en una relación en proporción de 30:08 % respectivamente, 2.4mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 3.2 mL de agua destilada, 100 µL de DSS al 10 % , 5 µL de Temed y 50 µL de persulfato de amonio al 10 % .

El gel del 4%, concentrador, se preparó con 1.33 ml de Acrilamida-BisAcrilamida con una relación en proporción de 30:08 %, 2.5 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 6.1 mL de agua destilada, 100 µL de DSS al 10 %, 16 µL de Temed y 80 µL de persulfato de amonio al 10 %.

A cada carril se le colocaron 40 μ l del antígeno, equivalente a una concentración de 36 μ g de proteína la cual fue preparada por ebullición por 5 min., en una solución reductora de Tris - HCl 1 M pH de 6.8; glicerol; SDS al 2%; azul de bromo fenol al 0.5%, etilen diamin tetra acético (EDTA); agua destilada, di- tiotreitól 5 Mm. y 2- β -mercaptoetanol al 5%.

El corrimiento se realizó en una cámara de Protean II xi Cell (Bio- Rad), utilizando un buffer de corrimiento preparado con 12 g de Tris, 57.6 g de Glicina, 40 ml de SDS al 10 %, y agua destilada la necesaria para aforar a 1 L. Se deja correr por espacio de dos horas, usando 100 mili amperes por gel. Se continuó con la tinción de uno de los geles con el colorante azul de Coomassie G- 250 y su secado en membranas de celofán.

Se usaron los siguientes marcadores de pesos moleculares: Fosforilasa (97 kDa), Albúmina sérica bovina (68 kDa), Ovo albúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (24 kDa) y Lisosima (14 kDa); el otro gel se usó para transferencia a papel de nitrocelulosa (NC).

TÉCNICAS INDIRECTAS

MICRO INMUNO DIFUSIÓN (MID)

Se elaboró un gel de agar al 1 % en agua destilada con 0.01 g de azida de sodio, para evitar contaminación; se colocó en una cantidad de 4.5 ml a 55°C sobre una laminilla de vidrio, una vez en forma sólida, se procedió a formar la roseta con un horador, con una equidistancia de 0.5 cm. entre pozo y pozo, la confrontación se hizo colocando siempre el antígeno en una cantidad de 20 μ L (18 μ g) en el centro y en torno a éste los suero sin diluir, ocupando siempre un suero control positivo y otro negativo, se dejó a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas hasta la presencia de líneas de precipitación entre el suero control positivo y el antígeno; luego se procedió a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250 en un 25 % en volumen (9).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA (IET)

El producto obtenido del corrimiento en gel de Poliacrilamida se transfirió a papel de NC, de acuerdo a lo descrito por Towbin (10), utilizando un buffer de transferencia preparado como sigue: 6.05 g de Tris 0.025 M, 28.8 g de Glicina 0.19M, 200 mL de metanol al 20% y agua destilada la necesaria para aforar a 1 L. Utilizando la cámara de Transblot- Cell (Bio-Rad®.) a 35 voltios, durante toda la noche a 4 ° C.

El papel de NC fue teñido con fast green (verde rápido) por 5 min. con agitación constante se retiró el colorante y fue decolorado en agua destilada para verificar transferencia de las proteínas, se dejó secar y se cortaron las tiras de un ancho aproximado de cada carril de 0.5 cm.

Transcurrido lo anterior, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS- leche descremada al 3% y azida de sodio al 0.15% a 4°C, con agitación constante por toda la noche. Enseguida se lavaron 3 veces por 10 min. con PBS, se continuó con la incubación por 1.5 hr. con los sueros problemas en una dilución de 1:100 en PBS- leche en polvo al 3% a 37°C con agitación constante; se lavaron enseguida por dos ocasiones con PBS- Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS por 10 min. A continuación se incubó con el segundo anticuerpo Anti- IgG de murino, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS- leche en polvo al 3% por 1 hr a temperatura ambiente, con agitación; después se lavaron 2 veces con PBS- Tween 20 al 3% y se enjuagaron con PBS por 10 min.

El patrón de Bando de cada tira se reveló con 3,3-DAB, 50 mg en 100 mL de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno al 37%.

REPRODUCCIÓN DEL CICLO BIOLÓGICO DE *T. spiralis*

Con el tejido encontrado positivo con LI de *T. spiralis*, por la técnica de compresión en placa, se infectaron tres ratas *Long Evans* con la finalidad de reproducir el ciclo biológico, comprobar la infectividad de las LI de *T. spiralis* detectadas en tejido de ratas del basurero municipal de Zacatecas. México.

RESULTADOS

CONCENTRACIÓN PROTEICA DEL ANTÍGENO:

La concentración de proteínas del AST de *T. spiralis* determinada por el método de Bradford resultó con un valor de 0.80 µg / µl de solución el cual, fue usado para todas las pruebas implementadas en los animales de estudio.

PATRÓN ANTIGÉNICO:

Al realizar la electroforesis en geles de Poliacrilamida de acuerdo a la técnica de Laemmli ésta reveló la presencia de una serie de bandas, las cuales están comprendidas en un rango de 97 a 24 kDa, donde se puede observar, la presencia del triplete inmunodominante característico de *T. spiralis* que oscila entre 42, 45 y 48 kDa

Técnicas directas:

Se encontraron 3 ratas positivas por compresión y digestión artificial. Al infectar tres ratas Long Evans por cada positivo, en todos hubo reproducción del ciclo vital de *T. spiralis*. (Fotografía 3).

Técnicas indirectas:

Para la MIDD, fue positiva en 3 animales.

Al desarrollar la técnica de IET usando una concentración del antígeno de 36µl y una dilución del anticuerpo del 1:100, se notó la presencia del reconocimiento de tres determinantes antigénicos de 42, 45 y 48 kDa, *T. spiralis* en los sueros de las ratas del basurero municipal se encontraron 3 positivos.

DISCUSION

En el presente estudio se detecto *T. spiralis* en la rata domestica del basurero municipal de Zacatecas, donde desafortunadamente es un espacio que tienen colonizado y es una fuente de diseminación de enfermedades y que desafortunadamente permite que haya la permanencia de esta zoonosis en el estado de Zacatecas

CONCLUSIONES

- 1.- Se detecto *Trichinella spiralis* en ratas domesticas del basurero municipal de Zacatecas
- 2.- Las técnicas directas son menos sensibles que las indirectas, pero son específicas.
- 3.- Con el tejido infectado con *T. spiralis* obtenido de rata domestica del basurero Municipal de Zacatecas hubo reproducción del ciclo vital de *T. spiralis* comprobándose su infectividad.

Fotografía 3.- Reproducción del ciclo vital de T. spiralis, al dar carne infectada con T. spiralis de rata domestica del basurero municipal de Zacatecas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moreno A. y Muñoz J. J. **1993**. Características de la Respuesta Inmune en *Trichinella spiralis*. Investigación Científica .1:17-28.
2. Domínguez A., Ramírez C., y Cob L.A. **1992**. Búsqueda de *Trichinella spiralis* en ratas de tres centros de engorda porcina ejidal de Yucatán. Revista Mexicana de Parasitología 3 (1) 32.
3. Contreras A. y Herrera R. **1992**. Triquinosis porcina en el estado de Zacatecas. Revista Mexicana de Parasitología 3(1) 25-27.
4. Moreno A., Saldivar S., Reveles G.R. y Muñoz J.J. **2000** los Modelos experimentales, Herramientas de estudio en trichinellosis. Revista Lat. de Microbiología. 42: 662.
5. Silva M., Vargas D., Vega F. y Sepúlveda R. **1997**. Técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico de la Trichinellosis porcina. Parasitología al día. 21:25-30.
6. Herrera R., Del Río A., Ávalos E. and Herrera R. M. **1987**. *Trichinella spiralis*: Immunochemical Characterization of Antigens in Experimental Infections. Experimental Parasitology 63:233-236
7. **Bradford H. and Laccetti A. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Anal.Biochem.72: 248-254.**
8. Laemmli U.K. **1970**. Cleavelage of structural protein during the assembly of the head of Bactériophage T4, Nature 227:680-685.
9. Oucherlony O. **1958**. Diffusion in gel method. In: For immunochemical analysis in Progress Allergy. ed. Kellos, P. Basel. New York. Vol.5.p 123.57.
10. Towbin H.T., Stahelin T., Gordon J. **1979**. Electrophoretic transfer of proteins from poliacrilamida gel to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.



REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria (ISSN n° 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesis, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional. Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org) <http://www.veterinaria.org> o en **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por **correo electrónico** solicitándolo a redvet@veterinaria.org Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html> Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> **Veterinaria Organización S.L.®** - (Copyright) 1996-2007- E_mail: info@veterinaria.org