

AVANCES Y PERSPECTIVAS EN EL DIAGNOSTICO DE LA TRIQUINELOSIS PORCINA

CAMILA ARRIAGA DÍAZ

*Departamento de Inmunología, CENID-Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y
Agropecuarias
Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos Km.
151/2, Carretera México-Toluca,
Palo Alto, 05110, México, D.F.*

LILIA YEPEZ MULLA Y GUADALUPE ORTEGA-PIERRES

*Departamento de Genética y Biología Molecular
Centro de Investigación y Estudios Avanzados
Instituto Politécnico Nacional Apartado Postal 14-
740, 07000, México D.F.*

I. Introducción	74
II. Características de los antígenos de la larva muscular de <i>Trichinella spiralis</i> útiles en el diagnóstico	75
III. Diagnóstico de la triquinelosis porcina	78
1. Pruebas de diagnóstico inmunológico	79
2. Perspectivas de la aplicación de meto- dologías del ADN recombinante en el diagnóstico	88
IV. Conclusiones	92
Referencias	99

I. Introducción

Los nemátodos son organismos multicelulares que incluyen a la mayoría de los patógenos más complejos de interés médico y veterinario. Tienen una amplia distribución geográfica, siendo las zonas tropicales los sitios en donde ocasionan problemas severos de salud pública (31). En este grupo de organismos se encuentra clasificado el parásito *Trichinella spiralis*, el agente causal de la triquinelosis. Esta enfermedad que se presenta en una gran variedad de huéspedes, incluyendo el hombre, ha cobrado importancia en años recientes ya que las fuentes de transmisión, en varios países, no han sido controladas adecuadamente. Así se informa acerca de brotes de la misma en diversas zonas del mundo, incluyendo México (32, 42, 43).

Un aspecto importante en el control de la triquinelosis es contar con métodos de diagnóstico adecuados que permitan detectar las fuentes de infección para el ser humano. Al respecto, varios estudios han demostrado que una de las principales formas de transmisión de esta parasitosis al hombre, es el consumo de carne de cerdo infectada con larvas viables de *Trichinella spiralis*. Por tanto, gran parte de los esfuerzos para prevenir la triquinelosis humana se enfocan a la detección, en los rastros, de cerdos infectados con este parásito. Si bien la detección del parásito en animales destinados al consumo humano se realiza, en general, por métodos como triquinoscopia o digestión artificial, dichos métodos resultan en ocasiones poco eficientes. Esto se debe, en gran parte, a que la cantidad de tejido muscular examinado no siempre es suficiente para poder detectar las larvas, sobre todo, en animales con cargas parasitarias leves. De esta forma, se propone como una alternativa para el diagnóstico de la triquinelosis porcina los métodos serológicos que utilicen antígenos específicos del parásito.

En este contexto, en años recientes se han efectuado varios estudios enfocados a identificar, purificar y caracterizar componentes antigénicos de *T. spiralis* con la finalidad principal, de estudiar su potencial diagnóstico.

II. Características de los antígenos de la larva muscular de *Trichinella spiralis* útiles en el diagnóstico

T. spiralis presenta a su huésped, al igual que muchos otros parásitos, un mosaico antigénico muy complejo, induciendo en este último respuestas inmunes tanto humorales como celulares específicas. Las últimas pueden amplificar y modular mecanismos inespecíficos, en los cuales participan una gran variedad de tipos celulares y procesos fisiológicos (36). Los antígenos de este parásito que inducen y activan estas respuestas inmunes se presentan en tres compartimientos: la superficie, los productos de excreción-secreción y el soma. De estos componentes aquellos que se localizan en la superficie o que son excretados por el parásito revisten mayor importancia, pues constituyen la interfase entre el parásito y el huésped. Este hecho estimuló la realización de una gran cantidad de estudios tanto en relación con su caracterización, como en cuanto a la utilidad de los mismos en el diagnóstico y protección.

De los tres estadios que se desarrollan durante el ciclo de vida de *T. spiralis*, el de la larva muscular ha sido estudiado de manera más amplia. Esto se debe, en gran medida, a que varios informes demostraron que la respuesta inmune que se genera en el huésped hacia este estadio del parásito genera una inmunidad protectora y resistencia a la reinfección (7, 9). Por otro lado, se considera que la alta inmunogenicidad de componentes de la larva permite emplear algunos de ellos en ensayos de diagnóstico (1). Así, varios componentes de este estadio han sido caracterizados, aun cuando los atributos funcionales de éstos no han sido completamente definidos, su

utilidad en el diagnóstico de triquinelosis, así como su papel protector en contra de la infección por el parásito, han sido ampliamente demostrados (4, 17, 18, 19, 22, 35, 38, 49, 50). En relación con los antígenos de superficie de la larva muscular, estudios pioneros de Philipp *et al.* (41) permitieron definir, mediante técnicas de radiomarcaje, que estos son pocos en número y con pesos moleculares de 47, 55, 90 y 105 Kd, estadio específico, y que pueden ser liberados activamente *in vitro* en el medio de cultivo en que se mantiene a los parásitos por periodos limitados. Análisis de afinidad a lectinas y de separación electroforética de estas proteínas en condiciones reductoras y no reductoras revelaron que el componente de 47 Kd es una glicoproteína, mientras que el antígeno de 55 Kd es de naturaleza proteínica solamente (40). Ambas moléculas forman dímeros, dando origen a un componente glicoproteínico de 90 Kd y una proteína de 105 Kd respectivamente. Los mapas peptídicos de las moléculas de 47 y 55 kd mostraron una alta homología 10 que sugirió la existencia de un polipéptido común para los cuatro antígenos de superficie de este parásito (40).

Estudios posteriores de Ortega-Pierres *et al.* (37) permitieron, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales, caracterizar más ampliamente los antígenos de superficie de este estadio del parásito. Cuando se empleó un anticuerpo monoclonal designado NIM-M1, se observó que reconocía 4 moléculas de superficie marcadas con 125 con pesos moleculares de 47, 55, 90 Y 105 Kd, mientras que otro anticuerpo monoclonal denominado NIM-M2 reconoció los componentes de 47 y 90 Kd, los cuales se encuentran glicosilados. El análisis por inmunofluorescencia de estos anticuerpos puso de manifiesto que el anticuerpo monoclonal NIM-M1 reconoció antígenos expuestos en la superficie del parásito, mientras que el anticuerpo monoclonal NIM - M2 no presentó reactividad hacia éstos; ello sugirió que los determinantes reconocidos por

este último anticuerpo no se encuentran expuestos en la superficie. Si bien dichas moléculas fueron consideradas como componentes de superficie, estudios realizados por Silberstein y Despommier (49), Capo *et al.* (12) y McLaren *et al.* (33), pusieron de manifiesto, por medio de ensayos inmunocitoquímicos, que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la superficie también reconocían componentes del esticosoma. Estudios más recientes de Takahashi *et al.* (57) demostraron que el origen de los antígenos de superficie son los gránulos α de los esticocitos que constituyen, con los gránulos β y γ , el esticosoma órgano secretor de la larva muscular que ocupa la parte media anterior del cuerpo del parásito. Se demostró así que los componentes de superficie/esticosoma comparten determinantes antigénicos con productos de excreción/secreción de este estadio del parásito.

Otros grupos de trabajo informan la caracterización de moléculas semejantes. Así, Silberstein y Despommier (49), mediante técnicas de cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales, purificaron moléculas de 48 y 50-55 Kd. El componente de 48 Kd se localizó en los B esticocitos y la superficie de la larva muscular; el componente de 50-55 Kd se detectó en los nesticocitos y sólo eventualmente en la cutícula. Gamble y Graham (18), con las mismas técnicas, lograron purificar dos componentes de 49 y 53 Kd a partir de productos de excreción/secreción. Dado que los pesos moleculares de los componentes aislados por los diferentes grupos de investigación eran muy semejantes, se propuso que se trataba de moléculas similares. Con el objeto de estudiar tal posibilidad, recientemente se realizó un taller para el análisis de diversas preparaciones antigénicas de *T. spiralis* y de anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, dirigidos contra antígenos de los tres estadios del parásito. En dicho evento participaron varios grupos de investigación, los cuales proporcionaron y analizaron independientemente los dife-

rentes reactivos biológicos. Los anticuerpos fueron analizados empleando técnicas de ELISA, inmunotransferencia, inmunoprecipitación y electroforesis en doble dimensión. En la caracterización de los antígenos de la larva muscular se emplearon extractos totales del parásito, productos de excreción-secreción y antígenos de superficie/esticosoma marcados radioactivamente. Los resultados de estos análisis, mostraron que la mayoría de los anticuerpos monoclonales y policlonales reconocieron moléculas muy similares en las diferentes preparaciones antigénicas estudiadas (2). Se propuso denominar a este grupo de antígenos TSL-1, cuyos pesos moleculares están comprendidos entre 40-50 Kd y 45-100 Kd en condiciones reductoras y no reductoras respectivamente. En el Cuadro 1 se incluyen los distintos grupos de antígenos clasificados según su reconocimiento por los diversos anticuerpos monoclonales empleados en este estudio.

Considerando que casi todos los anticuerpos monoclonales y policlonales analizados hasta ahora presentan un reconocimiento específico hacia los antígenos del grupo Ts LI, se sugiere que estas moléculas son inmunodominantes. Debido a esto, los antígenos de superficie/esticosoma y de excreciones-secreciones clasificados en este grupo pueden ser considerados como reactivos útiles y específicos en el diagnóstico de triquinelosis. En la siguiente sección, se describen los estudios realizados sobre el uso de estos componentes en el desarrollo de métodos para el diagnóstico de triquinelosis porcina.

III. Diagnóstico de la triquinelosis porcina

Los métodos tradicionalmente empleados para diagnosticar la triquinelosis en cerdos son la triquinoscopia y la digestión artificial con pepsina, los cuales permiten la detección directa del parásito en los tejidos. En México, las normas del Programa Nacional de Vigilancia de la Contaminación Química y

Biológica de los Alimentos establecen que en los rastros se debe usar un triquinoscopio o, por lo menos, un microscopio para la detección de *T. spiralis* en los tejidos de los animales que son sacrificados (48). Empero, en la mayoría de ellos no se efectúa ningún examen debido a que se carece del equipo necesario y a lo laborioso de los métodos.

Otro enfoque en el diagnóstico de triquinelosis porcina es el empleo de pruebas serológicas. Estas, generalmente más sensibles que los métodos de detección directa del parásito, permiten estudiar un número elevado de muestras en corto tiempo, por lo que pueden ser de mucha utilidad no sólo en los rastros, sino también en estudios epidemiológicos.

1. Pruebas de diagnóstico inmunológico

Algunas pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de la triquinelosis porcina son fijación de complemento, aglutinación de partículas de látex, hemoaglutinación pasiva, inmunofluorescencia y, más recientemente, métodos inmunoenzimáticos como el ensayo de ELISA y la inmunotransferencia (3, 6, 43, 46). De éstas, el ensayo de ELISA se emplea con mayor frecuencia en los últimos años, debido a su alta sensibilidad y facilidad de realización.

Los primeros estudios en los que se empleó un ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de triquinelosis en cerdos fueron realizados por *Ruitenbergetal.* (44). La prueba mostró ser más sensible que la inmunofluorescencia y la detección directa del parásito (29) aunque se observó un elevado número de falsos positivos (45). Esto se atribuyó, en algunos casos, a que fracciones del suero de cerdo pudieron interferir con la prueba (13). Otra posible explicación es la presencia de reacciones cruzadas con otros parásitos. En este aspecto, algunos autores (45,58) no encontraron que la presencia de otras parasitosis interfiriera con la especificidad de la prueba.

Sin embargo, estudios posteriores demostraron que hay epítomos en antígenos de *T. spiralis*, compartidos con otros parásitos que se encuentran comúnmente en los cerdos, como *Trichuris suis* o *Ascaris Suum* (18). De ahí que la presencia de alguno de ellos en el animal pueda afectar los resultados de la prueba de ELISA, en particular cuando se utilizan antígenos crudos de *T. spiralis* (4). Debido a esto, se ha puesto énfasis en el uso de antígenos purificados del parásito, de forma tal que su empleo ha incrementado la especificidad del ensayo de ELISA. Seawright *et al.* (47) compararon un antígeno crudo deslipidizado, un antígeno soluble de una fracción de la larva muscular enriquecida con gránulos secretorios del esticocito, denominada S3, y una preparación antigénica purificada obtenida al pasar la fracción S3 por una columna de afinidad cargada con anticuerpos anti-*T. spiralis*. De las pruebas realizadas se concluyó que la utilización de la fracción S3 purificada, en ensayos de ELISA, permitía detectar con mayor especificidad los cerdos infectados que cuando se emplea el antígeno crudo. Este mismo antígeno purificado se usó para determinar, por ELISA, la prevalencia de triquinelosis en cerdos del estado de Luisiana, Estados Unidos de América (24). Para ello, se obtuvieron muestras de suero y de diafragma de 1225 cerdos sacrificados en 21 rastros pequeños del sureste del estado. En estos ensayos se detectó un solo animal positivo por digestión artificial, mientras que cuatro (0.33%) resultaron positivos en ELISA, lo cual refleja la mayor sensibilidad de la prueba.

Por otro lado, Gamble *et al.* (17) observaron una mayor especificidad de la prueba de ELISA empleando antígenos de excreción-secreción que cuando se usó un extracto crudo del parásito. Una ventaja en el uso de antígenos de excreción-secreción es que éstos contienen un menor número de componentes que el extracto crudo, como se demostró por electroforesis en geles de poliacrilamida. El empleo de estos

antígenos en ensayos de ELISA permitió eliminar los falsos positivos. No obstante, se encontraron algunos sueros falsos negativos de animales infectados en el campo con cargas parasitarias de menos de 0.1 larvas/g de tejido. Una explicación a esta observación fue que el desarrollo de anticuerpos, en animales con cargas parasitarias ligeras, puede tardar varias semanas después de la infección, como se observó en este mismo trabajo en cerdos infectados experimentalmente con dosis bajas de larvas musculares.

En otro estudio, Gamble y Graham (18) purificaron dos componentes de excreciones-secreciones por cromatografía de afinidad con el anticuerpo monoclonal 7C2C5 y los utilizaron en ensayos de ELISA para detección de triquinelosis en cerdos. Los resultados de estos ensayos mostraron un incremento en la especificidad del ELISA al utilizar los antígenos purificados.

Posteriormente, Murrell *et al.* (35) emplearon los antígenos de excreción-secreción en un estudio de campo con muestras séricas de 168 cerdos, provenientes de hatos donde previamente se había diagnosticado esta parasitosis. Los resultados mostraron una sensibilidad de 92 a 93% y especificidad de 92 a 95%, que fueron determinadas empleando dos criterios para establecer el punto de corte de los animales positivos. Así, usando el criterio más estricto de 5 valores de densidad óptica arriba del promedio de los testigos negativos, 11 animales con infecciones leves de menos de 5 larvas/g fueron considerados falsos negativos. Sin embargo, cuando el punto de corte se consideró como 4 veces la densidad óptica de los testigos, sólo 6 cerdos que tenían menos de 11 larva/g dieron valores negativos. Por otra parte, se consideró que los cerdos al parecer falsos positivos podrían haber estado infectados, aunque no se detectaron larvas en los tejidos. Este sería el caso de animales con infecciones recientes en las que las larvas no se han establecido todavía en los músculos, o animales con infecciones

crónicas, los que podrían tener larvas en el músculo en proceso de calcificación, poco resistentes a la digestión con pepsina. Considerando lo anterior, Murrell *et al.* (35) concluyeron que el ensayo de ELISA era de gran utilidad para estudios epizootiológicos y potencialmente aplicable a la detección de cerdos infectados con *T. spiralis* en los rastros.

Smith (51), en un primer estudio empleando antígenos de excreción-secreción, encontró que cinco de 1009 cerdos examinados fueron negativos en ELISA, aunque por digestión artificial estos animales mostraban cargas parasitarias muy ligeras (0.01 a 0.046Iarvas/g). Las observaciones hechas por este autor y por otros (17) en animales infectados experimentalmente, sugieren que los resultados falsos negativos pueden deberse a que los cerdos con infecciones ligeras tardan mas tiempo en presentar seroconversión o a variaciones en la capacidad de los cerdos en responder a la infección por *T. spiralis*. Sin embargo, todas las infecciones de más de 1larva/g fueron detectadas. Posteriormente, Smith *et al.* (52) utilizaron la prueba de ELISA con los componentes de excreción-secreción para determinar la prevalencia de triquinelosis en cerdos canadienses. Los resultados mostraron que 4 de 15,318 cerdos (0.026%) fueron positivos. Dicho porcentaje es mucho mas bajo y seguramente mas exacto que el 2.5% encontrado por Faubert *et al.* (16), quienes utilizaron en el ELISA un extracto crudo, lo que pudo haber influido al observar un número elevado de falsos positivos. Dadas las ventajas de este ensayo empleando los antígenos de excreción-secreción, algunos autores han tratado de implementarlo en los rastros. Así, Isenstein *et al.* (27) evaluaron el uso de un "kit" comercial de ELISA * para el diagnóstico de triquinelosis en muestras séricas de 3211 cerdos de rastro. En este estudio, se analizaron también muestras de 5 g de diafragma de estos

* Idetek, Inc.

mismos animales, las cuales fueron analizadas por digestión artificial. Los resultados mostraron que ninguna de las muestras de tejido examinadas fue positiva en digestión artificial, mientras que en ensayos de ELISA se obtuvieron entre 0.5 y 8.8% de sueros seropositivos, utilizando tres distintos puntos de corte. Además, todos los cerdos con más de 1 larva/g fueron detectados en el ELISA. De este estudio, se concluyó que la confiabilidad de la prueba era por 10 menos equiparable a la de los métodos de digestión utilizados en Europa, ofreciendo además la ventaja de su facilidad de realización.

Asimismo, Oliver *et al.* (39) utilizaron también ensayos de ELISA para detección de triquinelosis en cerdos sacrificados en un rastro de gran volumen de Carolina del Norte, E.U.A. En este estudio se examinaron 20,987 sueros de cerdo por medio del ELISA con antígenos de excreción-secreción, encontrándose una prevalencia de 1.37 %. Los resultados de este ensayo se compararon con los obtenidos en pruebas de digestión de tejido muscular y se encontró que cuando se utilizaron muestras de 5 g de diafragma no se detectaron cerdos positivos. Sin embargo, al emplear mayor cantidad de tejido en las digestiones se encontraron larvas de *T. spiralis* en 2 de los 288 animales positivos en ELISA. En estos estudios, también se incluyeron 93 sueros de animales infectados en el campo y 35 sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis*. Todas estas muestras fueron seropositivas, excepto una de los cerdos infectados experimentalmente, con solo 3 larvas/g. Por tanto, se concluyó que era factible utilizar este método para detección de la triquinelosis porcina en rastros de gran volumen, ya que el proceso puede ser automatizado y permite identificar por 10 menos el 98% de los cerdos que pudieran infectar al ser humano.

Recientemente, Cowen *etal.* (14), en un estudio realizado en

el mismo estado encontraron mediante ensayos de ELISA una prevalencia de 0.38%, la cual difiere de la encontrada por Oliver *et al.* (39). Es probable que las diferencias se deban a que el punto de corte utilizado en los dos estudios fue diferente, ya que en el último se usó un criterio mas estricto. Asimismo, en este estudio no se encontró diferencia en el índice de prevalencia entre cerdos de granjas de ciclo completo y cerdos de desecho. Tampoco hubo diferencia entre la edad de los animales seropositivos y los negativos, aunque sí se encontró mayor número de machos positivos que de hembras y mayor número de animales seropositivos provenientes de explotaciones pequeñas. Otro aspecto que se señala en este trabajo es que la localización de las explotaciones puede influir en la prevalencia de la triquinelosis, como lo sugiere Campbell (10), ya que aparentemente esta parasitosis se encuentra en focos localizados.

Al igual que los productos de excreción-secreción, los componentes de superficie/estricosoma de la larva muscular de *T. spiralis* presentan gran potencial antigénico, ya que son los que se exponen mas directamente al sistema inmune del huésped. A este respecto, Arriaga *et al.* (4) evaluaron la utilización de estos antígenos para el diagnóstico de la triquinelosis en cerdos.

Inicialmente, para determinar cuáles de estos componentes son importantes durante la activación de la respuesta inmune y ser potencialmente útiles en el diagnóstico, se analizaron muestras séricas de cerdos infectados experimentalmente empleando ensayos de inmunotransferencia. En estos ensayos, los componentes del extracto total se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las que luego se incubaron con las muestras de sueros de cerdos infectados, colectadas a diferentes tiempos después de la infección experimental con *T. spiralis*.

Los patrones obtenidos en dicho estudio mostraron que cinco componentes de la larva muscular con peso molecular de 105,72,67,52 Y 47 Kd son reconocidos específicamente por los cerdos (Figura 1). De éstos, cuatro antígenos con peso molecular de 72, 67,52 y 47 Kd son los mismos que reconoce el anticuerpo monoclonal NIM-MI (Figura 2), obtenido por Ortega-Pierres *et al.* (37). Esto permitió emplear dicho monoclonal para purificar por cromatografía de afinidad los antígenos de superficie/esticosoma. Los componentes así purificados se usaron en ensayos de ELISA para el diagnóstico de triquinosis con sueros de cerdos de traspatio. En esta evaluación, se comparó el uso de los antígenos purificados con la utilización de extractos totales del parásito y antígenos de excreción secreción. Los sueros analizados provenían de animales de traspatio de los Estados de México, Veracruz y Michoacán. Los resultados (Figura 3) mostraron que con el extracto total se obtenía un número elevado de sueros aparentemente positivos. Sin embargo, al emplear los antígenos purificados o los de excreción-secreción, el número de sueros positivos fue considerablemente menor, 10 que sugiere que muchas de las reacciones positivas obtenidas con el extracto total eran inespecíficas. Estas últimas pudieron deberse a reacciones cruzadas, pues el examen coproparasitológico mostró que los cerdos de traspatio estaban muy parasitados, principal mente con *Hyostrogylus spp*, *Ascaris suum*, *Trichuris suis* e *Eimeria spp*. En relación con esto último, se observó que cuando se incluyeron en el ensayo de ELISA sueros de cerdos infectados experimental mente con *Ascaris suum* o *Trichuris suis*, los valores de densidad óptica obtenidos fueron elevados usando el antígeno crudo, mientras que estos disminuyeron al utilizar los antígenos purificados de superficie/esticosoma y los de excreción-secreción. En este mismo estudio, se empleó el ensayo de inmunotransferencia; los resultados mostraron que los sueros de cerdos de traspatio con valores positivos en

ELISA, usando los antígenos purificados, reconocían específicamente los mismos antígenos de la larva muscular de *T. spiralis*, detectados por cerdos infectados experimentalmente con el parásito.

En un estudio posterior de Arriaga *et al.* (5), se tomaron simultáneamente muestras de tejido muscular de diafragma y lengua, así como muestras séricas de cerdos de traspatio sacrificados en algunos municipios del Estado de México. Estos se analizaron por digestión artificial y ensayos de ELISA respectivamente; se encontró de nuevo que el empleo de antígenos purificados permite detectar de manera específica a los cerdos detraspatio infectados *por T. spiralis*. Esto se basa en el hecho de que hubo asociación entre la presencia de larvas en los tejidos y los valores positivos en ELISA. También se demostró por inmunotransferencia que los animales infectados tuvieron el mismo patrón de reconocimiento antigénico que los cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* (Figura 4).

En un estudio reciente, se compararon los resultados obtenidos con los métodos de compresión de tejido, digestión artificial, ELISA e inmunotransferencia en el diagnóstico de triquinelosis en cerdos sacrificados en rastros del estado de Michoacán. En éste se analizaron 250 muestras de tejido, las cuales fueron negativas en triquinoscopia y digestión artificial. Empero, cinco de estos cerdos mostraron valores positivos en ensayos de ELISA utilizando los antígenos de superficie/esticosoma purificados. Los resultados de este ensayo se confirmaron por inmunotransferencia, ya que los sueros positivos mostraron patrones de reconocimiento antigénico característicos de cerdos infectados por *T. spiralis* (Figura 4). Los resultados demuestran que los métodos más sensibles como el ELISA o la inmunotransferencia permiten un diagnóstico más certero de la triquinelosis porcina, porque es

posible detectar animales con infecciones ligeras que no pueden ser identificados por métodos directos.

El empleo de pruebas como la prueba de ELISA requiere de equipo especial que difícilmente se tiene en todos los rastros de México, por lo que actualmente se están desarrollando otras modalidades de ensayos inmunoenzimáticos como el Dot-ELISA, de fácil aplicación en el campo y los rastros. En esta prueba, el antígeno es fijado a papel de nitrocelulosa y la realización del ensayo es semejante al del ELISA estándar, pero con la ventaja de poderse leer directamente. En este contexto, Su y Prestwood (54) utilizaron este ensayo para detección de triquinelosis en sueros de cerdos y lo compararon con el ELISA estándar y la inmunotransferencia. Los resultados mostraron que la prueba, utilizando antígenos de excreción-secreción, era tan sensible como el ELISA o la inmunotransferencia y tan específica como la última. Recientemente, se han desarrollado ensayos tipo Dot-ELISA empleando antígenos purificados de superficie/estricosoma, los resultados preliminares mostraron que estos permiten discriminar los sueros de cerdos infectados experimentalmente de sueros de cerdos testigos no infectados. Hoy día, se evalúa la utilización de esta prueba para la detección de animales infectados en el campo.

Otro método que permite establecer inequívocamente la infección con *T. spiralis* es la detección de antígenos circulantes del parásito en el suero del animal infectado. Tal aspecto se ha abordado en estudios de triquinelosis en seres humanos y animales experimentales (11, 20, 21). En estos estudios, en los que se emplearon tanto anti cuerpos policlonales como monoclonales en ensayos de ELISA, se detectaron antígenos circulantes en ratas y en seres humanos desde los seis y los diez días posinfección, respectivamente. Es importante señalar que en estas pruebas, se presentan diferencias en cuanto a la efectividad de captación de antígenos circulantes por los

diferentes anticuerpos monoclonales, como 10 señalaron Gómez-García *et al.* (20), ya que uno de los dos anticuerpos monoclonales utilizados permitió la detección de antígeno circulante en mayor número de sueros de ratas infectadas experimentalmente. Ivanoska *et al.* (26), empleando el anticuerpo monoclonal 7C2C5 (18) en ensayos inmunoradiométricos, detectaron antígenos circulantes en el suero de 29/62 (47%) personas con triquinelosis clínica y 5/39 (13%) pacientes que habían sido expuestos a la infección, pero no presentaban signos clínicos de la enfermedad. En este mismo estudio se determinó, con la técnica de inmunofluorescencia, que los 62 sueros de las personas con signos clínicos y 18 de los 39 sospechosos tenían anticuerpos contra *T. spiralis*. El que se detectaran antígenos circulantes sólo en algunos de los pacientes seropositivos pudo deberse, como 10 sugieren los autores, a la baja concentración de antígenos *T. s.* en circulación o a la formación de complejos inmunes. Se han realizado ensayos preliminares empleando el anticuerpo monoclonal NIM-M1 en Dot-ELISA, los resultados hasta ahora obtenidos permiten detectar antígenos circulantes en el suero de cerdos infectados experimentalmente con el parásito, así como también en sueros de animales infectados en el campo.

Al considerar los últimos avances en cuanto a la aplicación de los métodos serológicos arriba mencionados, es posible proponer el empleo de éstos para efectuar muestreos serológicos en los distintos estados de la República Mexicana, lo que permitirá conocer la incidencia de la triquinelosis porcina en el país y detectar las zonas endémicas, ello contribuirá al control de esta parasitosis.

2. *Perspectivas de la aplicación de metodologías de ADN recombinante en el diagnóstico*

De acuerdo a lo expuesto en la sección anterior, es evidente

que el uso de antígenos purificados de la larva muscular de *T. spiralis* ofrece perspectivas positivas reales en el diagnóstico de la triquinosis porcina. Dado que estos ensayos se realizan a gran escala, su implementación requiere de una producción adecuada, rápida y no costosa. En este contexto, se puede recurrir al empleo de métodos bioquímicos e inmunoquímicos para llevar a cabo la purificación de estos componentes. Sin embargo, el costo y rendimiento de tales métodos puede presentar dificultades para su obtención constante y en cantidades necesarias para su uso a gran escala. Otras alternativas, que pueden presentar ciertas ventajas, son la preparación de péptidos sintéticos y la obtención de moléculas recombinantes por medio de la clonación de genes que codifican para antígenos de interés diagnóstico.

En el caso de antígenos de *T. spiralis*, se han clonado y expresado diversos componentes de la larva muscular de este parásito mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Algunos de ellos se han valorado en cuanto a su potencial en el diagnóstico de la enfermedad.

En estos estudios, el bacteriófago lambda gt11 ha sido el vector de clonación más empleado en la preparación de bancos de expresión de *T. spiralis*. La selección de clonas recombinantes a partir de estos bancos se realiza empleando sueros policlonales o anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes de excreción -secreción y de superficie/estricosoma de la larva muscular de este parásito. Por otro lado, la identificación de las proteínas nativas del parásito que comparten epítomos antigénicos con las proteínas de fusión producidas por las clonas recombinantes de lambda gt11 se realiza mediante ensayos de inmunotransferencia. En dichos ensayos se emplean extractos crudos de la larva muscular del parásito y anticuerpos seleccionados con las proteínas expresadas por las clonas recombinantes (34). Siguiendo estas estrategias, se informa la obtención de proteínas de

fusión, las cuales tienen el péptido de interés unido a una proteína codificada por el vector.

Sugane y Matsuura (56) clonaron el gen que codifica para un componente de excreción-secreción de la larva muscular de *T. spiralis*, con peso molecular de 46 Kd. La proteína de fusión obtenida reacciona específicamente con sueros de animales infectados por *T. spiralis* y no con sueros de otras infecciones. Zarlenga y Gamble (61) informaron sobre la clonación del gen que codifica para otra proteína de excreción-secreción con peso molecular de 54 Kd. Estos autores, empleando el péptido recombinante, determinaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra *T. spiralis* en ratones infectados experimentalmente a partir del día 14 pos-infección, alcanzándose un título máximo de anticuerpos para el día 28 pos-infección.

En este mismo contexto, Yépez-Mulia *et al.* (60) clonaron y expresaron varias proteínas híbridas que comparten determinantes antigénicos con los componentes de superficie/esticosoma de la larva muscular de *T. spiralis*. En estudios preliminares en donde se empleó una de las proteínas de fusión purificada se demostró que ésta es reconocida por sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis*. En dichos ensayos se incluyeron como testigos sueros normales de cerdo, además de sueros de cerdos infectados con *Ascaris suum* y *Trichuris suis*, obteniéndose baja reactividad de estos sueros con la proteína híbrida.

Una observación interesante hecha por Yépez-Mulia *et al.* (60) en sus estudios sobre clonación de antígenos de superficie/esticosoma, es que estos componentes parecen ser codificados por una familia multigénica. Esto último sugiere los resultados obtenidos en ensayos de hibridación tipo Northern, donde se encontró que el ADNc de las clonas recombinantes aisladas en este estudio hibridó con cuatro distintas especies de ARN mensajero de la larva muscular.

Recientemente, Su *et al.* (55), mediante técnicas recombinantes, sintetizaron oligonucleótidos a partir de la secuencia conocida de aminoácidos del antígeno de 49 Kd de la larva muscular de *T. spiralis*. Con estos oligonucleótidos y con la técnica de amplificación de ADN (PCR) se preparó el ADNc al gen que codifica para esta proteína. El ADNc así obtenido se clonó y expresó como proteína de fusión en *E. coli*. Esta última fue reconocida por sueros de cerdos infectados con *T. spiralis* en ensayos de inmunotransferencia.

En conjunto, los resultados de los estudios descritos antes demuestran la posibilidad de usar péptidos recombinantes en el inmunodiagnóstico de la triquinosis porcina. Una ventaja adicional de estos péptidos recombinantes es que pueden ser subclonados en vectores de expresión eficientes que permitan su obtención en grandes cantidades, así como su fácil purificación. A este respecto, recientemente se ha utilizado el vector pGEX para la subclonación de péptidos de diferentes parásitos (53). Este vector expresa el péptido de interés fusionado a la enzima glutatión transferasa, la cual permite la purificación de la proteína híbrida mediante cromatografía de afinidad, empleando el sustrato de la enzima. Los péptidos recombinantes obtenidos de esta manera han sido probados ampliamente en ensayos de protección y de diagnóstico de diferentes enfermedades parasitarias (8, 23, 25, 28, 30). Luego, resulta de interés el empleo de este vector en la producción de péptidos recombinantes de *T. spiralis*, porque ofrece posibilidades reales para su uso en el diagnóstico de la triquinosis porcina en los rastros y el campo.

Otro aspecto en el diagnóstico de animales infectados crónicamente con *T. spiralis*, implicaría la detección del parásito en tejidos del huésped empleando sondas de ADN específicas de éste. En el mismo contexto, Dupoy-Camet *et al.* (15) emplearon oligonucleótidos complementarios a una secuencia repetida de ADN de *T. spiralis* (1.7 kb) y la técnica

de amplificación de ADN para demostrar la presencia de *T. spiralis* en ratones infectados experimentalmente. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la sonda empleada detecta infecciones con *T. spiralis* y no las que ocurren con otras especies de *Trichinella*, como *T. nativa*. En consecuencia, el empleo de esta sonda de ADN podría ser de utilidad en el diagnóstico de triquinelosis porcina.

Los estudios señalados manifiestan el potencial real del uso de péptidos recombinantes para la detección específica y sensible de cerdos infectados por *T. spiralis*. Por último es importante considerar que la implementación de estudios epidemiológicos a gran escala, utilizando estos péptidos recombinantes, requerirá de un estudio sobre costos y beneficios en la aplicación rutinaria de los ensayos, tanto en rastros como en el campo.

IV. Conclusiones

Los conocimientos actuales en relación con los antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* permiten tener un panorama más completo respecto a su composición y utilidad en métodos de diagnóstico. Asimismo, con los resultados obtenidos por varios grupos de investigación en el análisis de estos componentes, se ha llegado a un consenso respecto a la alta inmunogenicidad y dominancia de los antígenos purificados de superficie/esticosoma y excreción-secreción en relación con la activación de mecanismos inmunes en los diferentes huéspedes que parasita *T. spiralis*. Dadas las características de estos componentes, un aspecto de vital importancia es definir, de manera más amplia, las atribuciones de éstos respecto a la función biológica que desempeñan en la relación huésped-parásito.

En cuanto a la utilidad de estos componentes en el diagnóstico de infecciones por *T. spiralis*, se ha demostrado

ampliamente, como se discutió en este trabajo, que su uso aumenta la especificidad y sensibilidad de los ensayos. Tales características, aunadas al hecho de contar actualmente con ensayos diagnósticos sencillos y de aplicación a gran escala, permiten considerar de manera real el uso a corto plazo de antígenos purificados de la larva muscular de *T. spiralis* en el diagnóstico de la triquinelosis porcina, tanto en rastros como en estudios epidemiológicos.

Los estudios sobre obtención de péptidos recombinantes de la larva muscular con potencial diagnóstico ofrecen amplias perspectivas en el mejoramiento de métodos para la detección de *T. spiralis* en poblaciones abiertas. Los métodos de diagnóstico descritos contribuirán a la identificación de focos de infección, así como al conocimiento de la prevalencia real de la triquinelosis porcina en México. Esto último permitirá contar con elementos indispensables para establecer programas de control efectivos para la erradicación de esta parasitosis en la República Mexicana.

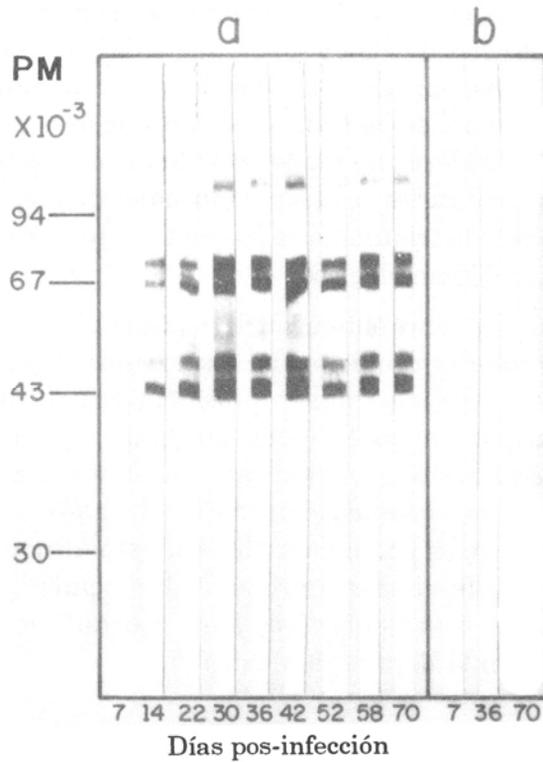


Fig. 1. Antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* reconocidos por sueros de cerdos infectados experimentalmente con el parásito. Los componentes del extracto crudo se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa se incubaron con sueros de cerdos infectados con *T. spiralis*, colectados a diferentes intervalos después de la infección (a) y sueros de cerdos no infectados (b). Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como marcadores se indican en la figura. Tornado de Arriaga *et al.* (4).

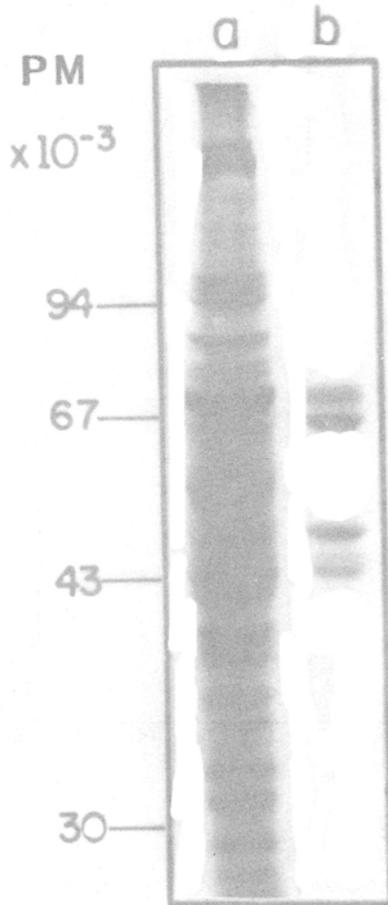


Fig. 2. Análisis electroforético de los antígenos de superficie de la larva muscular. El extracto total de la larva muscular de *T. spiralis* se pasó por' una columna de Sepharosa 4B a la que se acopló el anticuerpo monoclonal NIM-MI, para purificar los antígenos de superficie/esticosoma. (a) Componentes del extracto total. (b) Antígenos purificados. Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como marcadores se indican en la figura. Tomado de Ortega-Pierres *et al.* (38).

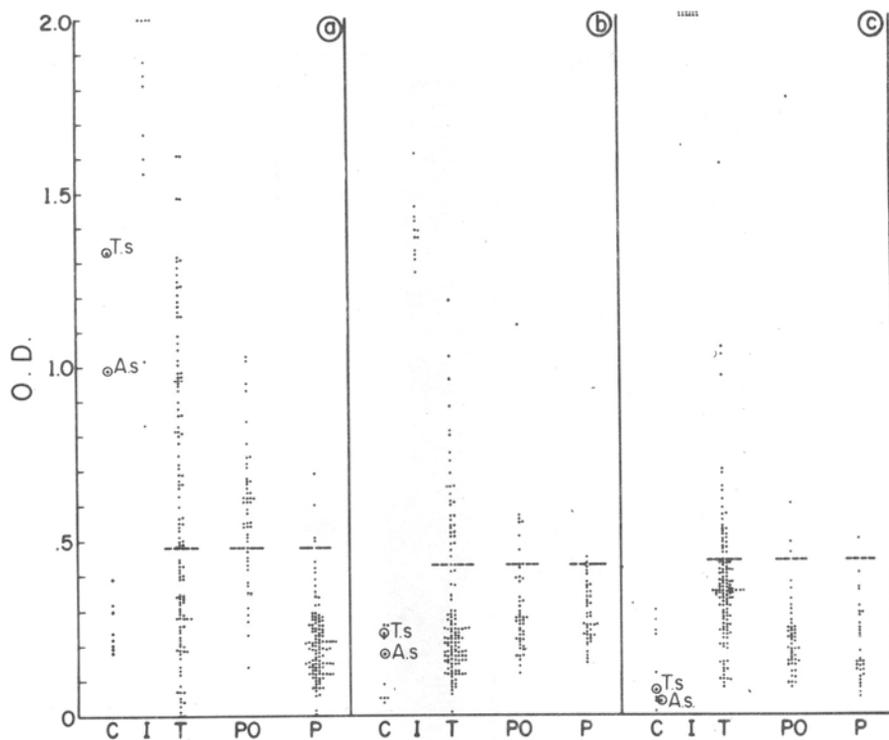


Fig.3. Valores de densidad óptica (O.D.) de sueros de cerdos de traspatio obtenidos en ensayos de ELISA con el extracto crudo. (a) Los antígenos de superficie/esticosoma purificados (b) o los antígenos de excreción-secreción y (c) de la larva muscular de *T. spiralis*. Como testigos se utilizaron sueros de cerdos no infectados (C) y sueros de cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis* (I), *A. suum* (A.s.) o *T. suis* (T.s.). Los cerdos de traspatio provenían de Toluca, Edo. de México (T), Paso de Ovejas, Veracruz (PO) y Paracho, Michoacán (P). Tomado de Arriaga *et al.* (4).

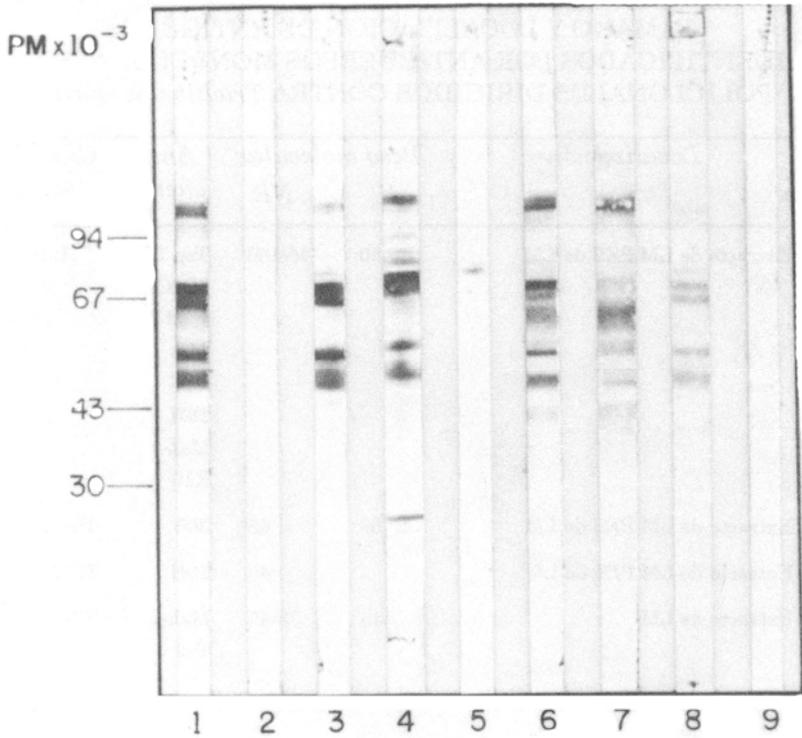


Fig.4. Antígenos de la larva muscular de *T. spiralis* reconocidos en inmunotransferencia por sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente con el parásito. (1) Suero de cerdo infectado experimentalmente. (2) Suero de cerdo testigo infectado. (3-4) Sueros de cerdos positivos en digestión artificial y en ELISA con los antígenos purificados de superficie/esticosoma. (5 y 9) Sueros de cerdos negativos en digestión artificial y en ELISA. (6-8) Sueros de cerdos negativos en digestión artificial y positivos en ELISA con los antígenos purificados de superficie/esticosoma. Los pesos moleculares de las proteínas empleadas como marcadores se indican en la figura.

CUADRO 1
TAMANO Y LOCALIZACION DE ANTIGENOS
IDENTIFICADOS POR ANTICUERPOS MONOCLONALES Y
POLICLONALES DIRIGIDOS CONTRA *Trichinella spiralis*

<i>Localización</i>	<i>Peso molecular Anti-</i>		<i>Clasifi-</i>	<i>cación</i>
	<i>R</i>	<i>NR</i>		
Extracto de LM PES de LM	40-50	45-100	Tsp 1~30 7C2C5 NIM-M1 fID4 fIEG 18H Mab-1 E10	TSL-1
Extracto de LM PES de LM	40-50	45	~305	TSL-2
Extracto de LM PES de LM		45	1GH	TSL-3
Extracto de LM	45	:35-45	Mab-2 Ts2	TSL-4
Extracto de LM PES de LM	~30-3G	:3G	GD8	TSL-5
Extracto de LM PES de LM		17	Mab-5	TSL-6
Extracto de LM	32-45	:32-45	GEI	TSL-7
Extracto de LM	40-45	43	Mab-G	TSL-8
Extracto de adulto	40		10E8	TSA-1

LM = Larva muscular.

PES= Productos de excreción-secreción.

N = Peso molecular estimado en condiciones reductoras.

NR = Peso molecular estimado en condiciones no reductoras.

Tornado de Appleton *et al.* (2)

Referencias

1. **Almond, N.M. and Parkhouse, R.M.E.:** Nematode antigens.
In: *Current Topics in Microbiology*. Edited by Parkhouse, R.M.E. Springer-Verlag, Heidelberg. 120:173-203, 1985.
2. **Appleton, J. A., Bell, R.G., Homan, W. and Knapen van, F.:** Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*. 7 (8):190-192, 1991.
3. **Arriaga, C.:** Inmunodiagnóstico de la triquinosis en cerdos.
En: *Diagnóstico y Control de Parásitos de Animales y el Hombre*. Editado por Quiroz Romero, H. Universidad Nacional Autónoma de México, 722-744, 1991.
4. **Arriaga, C., Muñoz, E., Morilla, A. and Ortega- Pierres, G.:** *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. *Exp. Parasitol.* 69:363-372, 1989.
5. **Arriaga, C., Salinas-Tobón, R., Morilla, A. and OrtegaPierres, G.:** Use of purified surface/stichosomal antigens of *Trichinella spiralis* muscle larva in the detection of naturally infected swine. *Res. Rev. in Parasitol.* (en prensa).
6. **Bautista-Garfias, C.R.:** Diagnóstico serológico de la triquinosis porcina. En: *Avances en enfermedades del cerdo*. Editado por Morilla, A, Correa, P. y Stephano, A Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, AC. México, D.F., 587-589, 1985.
7. **Bell, R.G., McGregor, D.D., and Despommier, D.D.:** *Trichinella spiralis*: mediation of the intestinal component of protective immunity in the rat by multiple, phase-specific antiparasite responses. *Exp. Parasitol.* 47: 140-157, 1979.
8. **Bose, R., Jacobson, R.H., Gale, K.R., Waltisbuhl, D.J. and Wright, I.G.:** An improved ELISA for the detection of antibodies against *Babesia bovis* using either a native or a recombinante. *bovis* antigen. *Parasitol. Res.* 76: 648-652, 1990.
9. **Campbell, W.C.:** Immunizing effect of enteral and parenteral infections of *Trichinella spiralis* in mice. *J. Parasitol.* 51: 185-194, 1965.

10. **Campbell, W.C.:** Epidemiology 1- Modes of transmission. In: *Trichinella and trichinosis*. Edited by Campbell, W.C., Plenum Press, New York and London, 425-444, 1983.
11. **Candolfi, E., Frache, P., Liance, M., Houin, R. and Kien, T.:** Detection of circulating antigen in trichinellosis by immunoenzymology, comparative results in mices, rats and humans. In: *Trichinellosis, Proceedings of the 7th Int. Conf. on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C.E., Martínez-Fernández, A.R. and Bolas-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 194-202, 1989.
12. **Capo, V., Despommier, D.D. and Silverstein, D.S.:** The site of ecdysis of the Larva of *Trichinella spiralis*. *J Parasitol.* 70: 992-994, 1984.
13. **Clinard, E.H.:** Identification and serum distribution of swine serum immunoglobins that react with *Trichinella spiralis* antigens and may interfere with the enzyme-labeled antibody test for trichinosis. *Am. J. Vet. Res.* 40:1558-1563, 1979.
14. **Cowen, P., Shugen, L. and McGinn III, T.:** Survey of trichinosis in breeding and cull swine, using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 51:924-928, 1990.
15. **Dupouy-Camet, J., Soule, C., Guillou, J.P., Rouer, E., Lavareda de Souza, S., Aneelle, T. and Benarous, R.:** Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitol. Res.* 77:180-182, 1991.
16. **Faubert, G.M., Viens, P. and Magluilo, P.:** Superiority of the ELISA technique over parasitological methods for detection of trichinellosis in slaughtered pigs in Canada. *Can. J. Comp. Med.* 49:75-78, 1985.
17. **Gamble, H.R., Anderson, W.R., Graham, C.E. and Murrell K.D.:** Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory 5 antigen. *Vet. ParaBitol.* 13:349-361, 1983.
18. **Gamble, H.R. and Graham, C.E.:** Monoclonal antibody purified antigen for the immunodiagnosis of trichinosis. *AM. J Vet. Res.* 45:67-74, 1984.

19. **Gamble, H.R.:** *Trichinella spiralis*: immunization of mice using monoclonal antibody affinity isolated antigens. *Exp. Parasitol.* 59:398-404, 1985.
20. **Gómez-García, V., Rodríguez-Pérez, J., RodríguezOsorio, M., Gómez-Morales, M.A., Peinado-Peláez. M. and Rojas-Gonzalez, J.:** Use of monoclonal antibodies for the detection of *Trichinella* circulating antigens. In: *Trichinellosis, Proceedings of the 7th Int. Conf on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C.E., Martínez-Fernández, A.R. and Bolas-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 188-191, 1989.
21. **Gómez-Morales, M.A., Gómez-García, V., and Rodriguez-Osorio, M.:** Experimental trichinosis in rats. Detection of circulating antigens during the enteral phase by means of the micro-ELISA method. *Rev. Iber. Parasitol.* 47:169-174, 1987.
22. **Grencis, R.K., Crawford, C., Pritchard, D.!, Behnke, J.M. and Wakelin, D.:** Immunization of mice with surface antigens from the muscle larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* 8:587-596, 1986.
23. **Hemmings, L. and McManus, D.P.:** The diagnostic value and molecular characterisation of an *Echinococcus multicularis* antigen gene clone. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 44: 5-3-62, 1991.
24. **Hugh-Jones, M.E., Stewart, T.B., Raby, C. Morrison, J. E. Isenstein, R.S. and Klei, T.R.:** Prevalence of trichinosis in southern Louisiana swine. *Am. J. Vet. Res.* 46: 463-465, 1985~
25. **Ho, A., Hogg, 11.0., Lightowers, M.W., Mitchell, G.F., Takami, T., Kamiya, M., Onitake, K. and Rickard, M.D.:** Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Mol. and Biochem Parasitol.* 44: 4352, 1991.
26. **Ivanoska, D., Cuperlovic, K., Gambel, H.R. and Murrell, K.D.:** Comparative efficacy of antigen and antibody detection test for human trichinellosis. *J. Parasitol.* 75: 38-41, 1989.
27. **Isenstein, R.S., Webert, D.W., Leighty, J.C., Zimmerman, W.J., Singh, P., Oliver, D.G. and Jang, L.:** Development of

an industrial immunoassay for trichinellosis. In: *Trichinellosis, Proceedings of the 7th Int. Confon Trichinellosis*. Edited by Tanner, C.E., Martínez- Fernández, A.R. and Bolas-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 262-267, 1989.

28. **Jonhson, K.S., Harrison, G.B.L., Lightowlers, M.W., O'Hoy, K.L., Cogle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vintons, J.G., Health, D.D. and Rickard, M.D.:**
Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 338:585-587, 1989.
29. **Knapen, van, F., Franchimont, J.H., Ruitenbergh, E.J., Baldelli, B., Gibson, T.E., Gottal, C., Henrikson, S.A., Kholer, G., Skovgaard, N., Soule, C. and Taylor, S.M.:**
Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of *Trichinella spiralis* infections in pigs. *Vet. Parasitol.* 109: 1217, 1980.
30. **Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Lafaile, J., Pereira, J.B., Krieger, H., Carvalho, M.R. and Goldenberg, S.:** Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46 (4):427-434, 1992.
31. **Maizels, R.M., Philipp, M. and Ogilvie, B.M.:** Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* 61: 109, 1982.
32. **Martínez-Marañón, R.:** Esta aumentando la triquinosis en México? Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro "desarrollo"? *Salud Pública Mex.* 27: 40-51, 1985.
33. **McLaren, D.J., Ortega-Pierres, G. and Parkhouse, R.M.E.:** *Trichinella spiralis*: immunocytochemical localization of surface and intracellular antigens using antibodies probes. *Parasitology.* 94: 104-114, 1987.
34. **Miles, M.A., and Clarke, J.L.:** Immunoselection techniques for cloning DNA-encoding parasite-specific antigens. *Parasitology Today.* 6(1):25-27, 1989.
35. **Murrell, K.D., Anderson, W.R., Schad, G.A., Hanbury, R. n .. Kasakos. K.R .. Gamble, H.R. and Brown, J.:** Field

- evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis: Efficacy of the excretory-secretory antigen. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1046-1049, 1986.
36. **Ogilvie, B.M. and De Savigny, D.:** Immune response to nematodes. In: *Immunology of Parasitic Infections*. Ed. by Cohen, S. and Warren, K.S., Blakwell Scientific Publications, 715-717, 1982.
 37. **Ortega-Pierres, G., Chayen, A., Clark, N.W.T. and Parkhouse, R.M.E.:** The occurrence of antibodies to hidden and exposed determinants of surface antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. 88: 359-369, 1984.
 38. **Ortega-Pierres, M.G., Muñiz, E., Vazquez-Coral, R. and Parkhouse, R.M.E.:** Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol. Res.* 75:563-567, 1989.
 39. **Oliver, D.G., Singh, P., Allison, D.E., Murrell, K.D. and Gamble, H.R.:** Field evaluation of an enzyme immunoassay for detection of trichinellosis in hogs in a high volume North Carolina abattoir. In: *Trichinellosis, Proceedings of the 7th Int. Conf on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C.E., Martinez - Fernández, AR. and Bolas-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 439-445, 1989.
 40. **Parkhouse, R.M.E., Philipp, M. and Ogilvie, B.M.:** Characterization of surface antigens of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Parasite Immunol.* 3: 339-352, 1981.
 41. **Philipp, M., Parkhouse, R.M.E. and Ogilvie, B.M.:** Changing proteins on the surface of parasitic nematodes. *Nature, London* 287:538-540, 1980.
 42. **Ramírez-Valenzuela, M.:** La triquinelosis en México. Un estudio epidemiológico retrospectivo. En: *Avances en enfermedades del cerdo*. Editado por Morilla, A, Correa, P. y Stephano, A. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A C. México, D.F., 557-573, 1985.
 43. **Ramírez Valenzuela, M.:** Epidemiología de la triquinelosis. En: *Ciencia Veterinaria*. Editado por Moreno Chan, R. Universidad Nacional Autónoma de México, 3:278-334, 1981.

44. **Ruitenbergh, E.J., Teerenbergh, P.A., Brossi, B.J.M. and Buys, J.:** Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme linked immunosorbent assays. *Bull. W. H. O.* 51: 108-109, 1974.
45. **Ruitenbergh, E.J., Steerenbergh, P.A., Brossi, B.J.M. and Buys, J.:** Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in conventionally raised pigs. *J. ImmunoL. Methods.* 10:67-83, 1976.
46. **Ruitenbergh, E.J., Knapen, van, F. and Elgersma, A.:** Control III: Surveillance in swine by immunodiagnostic methods. In: *Trichinella and Trichinosis*. Edited by: Campbell, W.C., Plenum Press, New York and London, 529-550, 1983.
47. **Seawright, G.L., Despommier, D.D., Zimmerman, W. and Isenstein, R.S.:** Enzyme immunoassay for swine trichinellosis using antigens purified by immunoaffinity chromatography. *Arnel'. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 1275-1284, 1983.
48. Secretaría de Salubridad y Asistencia: Manual de procedimientos para la determinación de contaminantes parasitarios. En: *Programa Nacional de Vigilancia de La Contaminación Química y Biológica de Los Alimentos.* 20-33, 1978.
49. **Silberstein, D.S. and Despommier, D.D.:** Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response In the mouse. *J. Immunol.* 132: 898-904, 1984.
50. **Silberstein, D.S. and Despommier, D.D.:** Effects on *Trichinella spiralis* of host responses to purified antigens. *Science*, 227: 948-950, 1985.
51. **Smith, H.J.:** Evaluation of the ELISA for the serological diagnosis of trichinosis in Canadian swine. *Can. J. Vet. Res.* 51: 194-197, 1987.
52. **Smith, H.J., Snowdon, K.E. and Bishop, L.J.:** Prevalence of trichinosis in Canadian swine determined serologically by enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet.* 52: 392-393, 1988.
53. **Smith, D.B. and Johnson, K.S.:** Single step purification of

- polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 67: 31-40, 1988.
54. **Su, X. and Prestwood, A.K.:** A dot ELISA mimicry western blot test for the detection of swine trichinellosis. *J. Parasitol.* 77: 76-82, 1991.
 55. **Su, X., Prestwood, A.K. and McGraw, R.A.:** Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of *Trichinella spiralis*. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 45: 331-336, 1991.
 56. **Sugane, K. and Matsuura, T.:** Molecular analysis of the gene encoding an antigenic polypeptide of *Trichinella spiralis* infective larvae. *Journal of Helminthology.* 64: 1-8, 1990.
 57. **Takahashi, Y., Mizuno, T.V., Tokuda, C. and Araki, T.:** Direct evidence that the cuticle surface of *Trichinella spiralis* muscle larvae shares antigenicity with stichocyte alfa granules and the esophagus-occupying substance. *J. Parasitol.* 76(2):290-293, 1990.
 58. **Taylor, S.M. and Kenny, J.:** The influence of concurrent infection with *Oesophagostomum* species on the interpretation of the ELISA test for trichinosis in pigs. *Vet. Parasitol.* 4:257-264, 1978.
 59. **Wakelin, D. and Denham, D.A.:** The immune response. In: *Trichinella and Trichinosis*. Edited by Campbell, W.C., Ed. Plenum Press, 265-337, 1983.
 60. **Yepez-Mulia, L., Montanez, C. and Ortega-Pierres, M.G.:** Surface antigens from *Trichinella spiralis* muscle larvae expressed by *Escherichia coli*. In: *Trichinellosis, Proceedings of the 7th Int. Conf on Trichinellosis*. Edited by Tanner, C.E., Martínez-Fernández, A.R. and Bolas-Fernández, F. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Press, Madrid, Spain, 47-52, 1989.
 61. **Zarlenga, D.S., and Gamble, H.R.:** Molecular cloning and expression of an immunodominant 53- kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Mol. and Biochem. Parasitol.* 42: 165-174, 1990.