

Archivos de Medicina
Asociación Española de Médicos Internos Residentes
editorial@archivosdemedicina.com
ISSN (Versión impresa): 1698-9465
ESPAÑA

2006

Sergio H. Sánchez Rodríguez / Berenice Luna Sánchez
TRIQUINELOSIS: MODELO DE ESTUDIO Y TÉCNICAS DE DIAGNOSTICO
CLÍNICO

Archivos de Medicina, año/vol. 2, número 006
Asociación Española de Médicos Internos Residentes
Madrid, España

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal



Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>

Triquinelosis: modelo de estudio y técnicas de diagnóstico clínico

Trichinellosis: model of study and technicals of clinical diagnostic

Autores: Sergio H. Sánchez-Rodríguez*, Berenice Luna Sánchez**

* Doctor en Ciencias (Fisiología). Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

** Q.F.B. Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas.

Correspondencia: Departamento de Biología Celular. Unidad Académica de Biología Experimental. Fernando Villalpando #80. Col. Ramón López Velarde. Guadalupe, Zacatecas, México. C.P. 98600. Tel/Fax (492) 921-13-26.

E-mail: smdck@hotmail.com

RESUMEN

Las Zoonosis son enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre. La triquinelosis es una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies, subespecies y cepas de nematodos del género *Trichinella*. En humanos, la infección más prevalente es causada por *T. spiralis* la cual tiene una amplia distribución en todo el mundo, constituyendo un problema de salud pública.

Trichinella spp. son nematodos inusuales comparados con la mayoría de los parásitos intracelulares. *T. spiralis* afecta a todos los mamíferos y puede ser transmitida al hombre por la ingestión de carne o productos cárnicos mal cocidos o crudos que contengan quistes viables.

Palabras Clave: Triquinela, triquinelosis, *T. spiralis*

ABSTRACT

Zoonosis are transmissible between animals and the man illnesses. Trichinellosis is a zoonotic illness caused by different species, subspecies and stumps of nematodes of kind trichinella. In human, the infection more prevalent is caused by *T. spiralis* which has a world wide distribution, constituting a problem of public health.

Trichinella spp. Are nematodes unusual compared with most of the intracellular parasites. *T. spiralis* affect all the mammals and it can be transmitted to the man for the meat ingestion or not cooked meat products or raw that contains viable cysts.

Key words: *Trichinella*, Trichinellosis, *T. spiralis*

INTRODUCCIÓN

Las Zoonosis son enfermedades transmisibles entre los animales y el hombre, cuyo origen conceptual se le atribuye a Rudolf Virchow. ^[1,2] La triquinelosis fue descrita por Owen (1835), ^[3] es una enfermedad parasitaria causada por el nematodo *Trichinella spiralis*, infecta el músculo de prácticamente todos los mamíferos, se ha reportado en casi todo el mundo, su prevalencia es alta en Europa y Asia. La enfermedad en el ser humano se transmite por la ingesta de carne infectada y sus productos crudos o mal cocidos, sobre todo de cerdo. ^[4]

La larva infectante (LI) de *T. spiralis* se encuentra en mamíferos incluyendo al hombre, su ciclo biológico incluye 3 estadios; adultos, larva recién nacida (LRN) y larva infectante (LI). ^[4,5]

ESTUDIO DE LA TRICHINELLOSIS

El estudio de la triquinelosis es de capital importancia a nivel mundial tanto en investigación clínica como básica, ya que los hallazgos contribuyen a un mejor diagnóstico y sobretodo, conocer los mecanismos que participan en la inducción y permanencia de la enfermedad causada por éste nematodo.

Existen un número importante de técnicas de diagnóstico y modelos de estudio animal utilizados para conocer los mecanismos de infección de la trichinellosis. Dentro de los modelos de estudio animal están el cerdo (principal vector de infección al humano por el consumo de su carne), gato domestico, conejos Nueva Zelanda, ratas Long Evans, ratones Balb/c, perro domestico, Hámster, entre otros. El presente trabajo muestra un panorama de los modelos de estudio y pruebas de laboratorio en el diagnóstico de *T. spiralis*.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de la triquinelosis se apoya en diferentes datos clínicos y pruebas de laboratorio. ^[6]

La identificación directa o indirecta del parásito permite la confirmación del diagnóstico clínico, y se apoya en diferentes técnicas como son: La triquinoscopia (compresión), la digestión artificial, el xenodiagnóstico, análisis histopatológico, estudio parasitoscópico (coproparasitoscópico), intradermorreacción de Bachman, reacción de floculación con bentonita, ELISA, Western blot, inmunofluorescencia indirecta, la inmunodifusión doble, entre otras. ^[7,8,9,10,11]

En la presente trabajo se hace la descripción de algunas técnicas utilizadas con fines de diagnóstico y de investigación clínica-básica y sus resultados. Como modelo de estudio animal hemos utilizado a la rata.

METODOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE *T. spiralis*.

Modelo animal y método de infección. Se utilizaron ratas Long Evans hembras con una edad promedio de dos meses y medio, con un peso aproximado de 250 gramos. Cada animal fue infectado con 500 LI de *T. spiralis* por vía oral (trozo de carne infectada)(Xenodiagnóstico).

Determinación del ciclo biológico de *T. spiralis* en rata. Las ratas infectadas con *T. spiralis* se sacrificaron desde el primer día hasta el 30 post-infección. Se obtuvo suero, tejido intestinal (duodeno, yeyuno e íleon) y muscular (pierna, masetero, lengua, diafragma). El suero se obtuvo para llevar a cabo la determinación de la respuesta inmune del huésped durante el ciclo biológico de *T. spiralis*. Del día 1 al 16 se realizaron cortes de tejido intestinal, así como de los días 1 al 40 los cortes correspondieron a tejido muscular. Una parte del tejido se utilizó para la técnica de Western blot (5 mg), otro para compresión en placa (50 mg de tejido entre 2 portaobjetos), otro para digestión artificial (60 gr.) y otro para inclusión en Tissue-Tek (Sakura, O.C.T. 4583). A los tejidos musculares incluidos en Tissue-Tek, se realizaron cortes para analizar la presencia de nematodos por inmunofluorescencia y otros para tinción con hematoxilina-eosina.

Análisis histopatológico (Tinción con hematoxilina-eosina). El tejido en los portaobjetos fue introducido 5 minutos en xileno., 3 minutos en alcohol etílico absoluto., 3 minutos en alcohol etílico de 96°, agua potable y agua destilada (de manera rápida), hematoxilina de Harris (por unos segundos), agua potable, alcohol ácido 1% (de manera rápida), agua potable, solución saturada de carbonato de litio 2 minutos., agua potable, eosina (por unos segundos), agua potable, 2 cambios de alcohol etílico de 96°, tres cambios de alcohol etílico absoluto, xileno (todos los pasos anteriores fueron de 1 min.). Las preparaciones fueron montadas con resina sintética (Sigma) quedando listas para su análisis al microscopio (Figura 1).^[12,13]

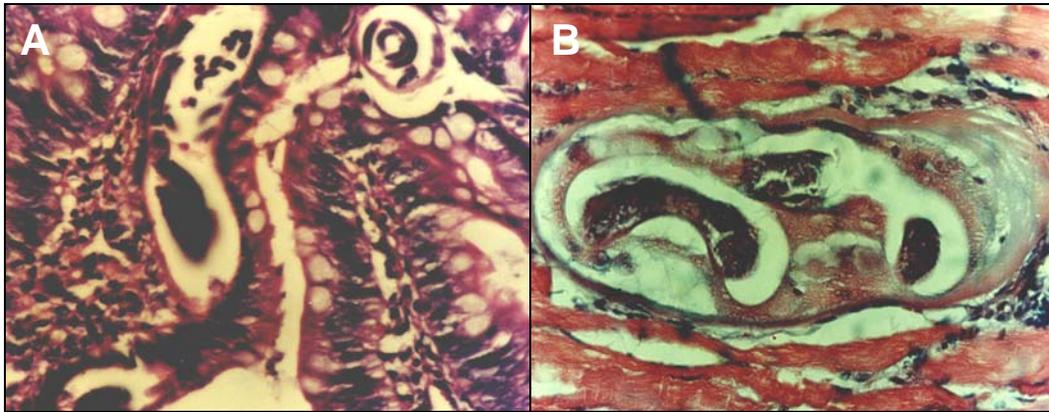


Figura 1. *T. spiralis* en tejido de ratas Long Evans: tinción con hematoxilina-eosina, corte longitudinal. (A) Presencia de hembras adultas en vellosidades a nivel intestinal (yeyuno) a los 7 días post-infección. (B) Célula nodriza en tejido muscular a los 30 días post-infección.

Triquinoscopia (compresión). El trozo de carne infectada (50 mg de tejido) se colocó entre dos portaobjetos fuertemente unidos para después observar al microscopio. Si es positivo, se ven los quistes con larvas en su interior o éstos pueden estar calcificados si corresponden a la fase clínica de un estado mayor de 24 meses (Figura 2a y 2b).

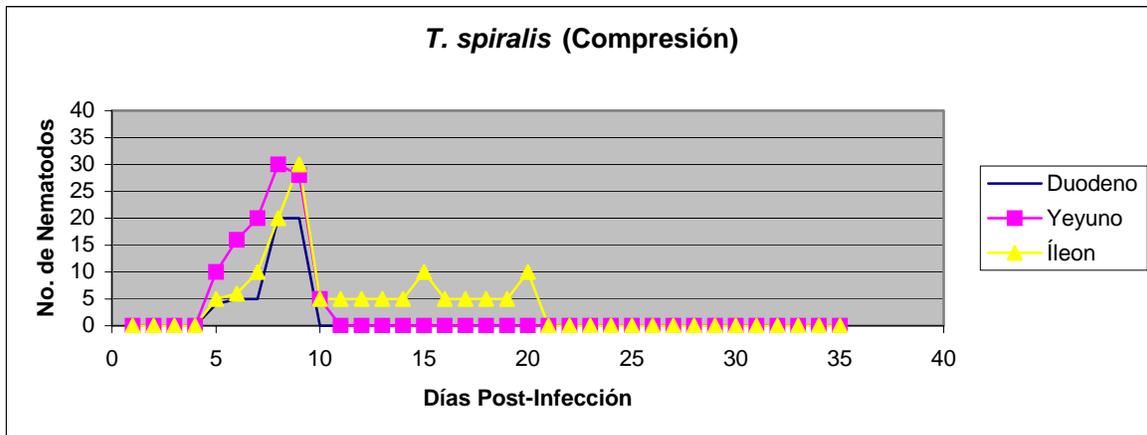


Figura 2(a). Conteo por el método de compresión del número de nematodos en fase intestinal de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis*. Esta técnica nos permite analizar el ciclo biológico de *T. spiralis* en un huésped.

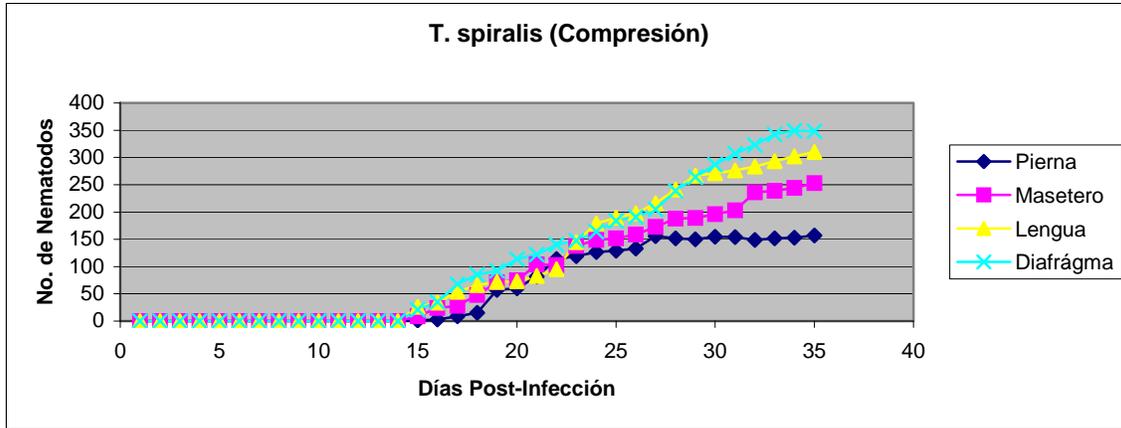


Figura 2(b). Conteo por el método de compresión del número de nematodos en fase muscular de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis*. Esta técnica nos permite analizar el ciclo biológico de *T. spiralis* en un huésped.

Xenodiagnóstico. A partir de biopsias musculares infectadas, se da a comer a una rata joven sana de laboratorio y al cabo de 3 a 4 semanas se examina mediante una biopsia por compresión, digestión artificial o tinción con hematoxilina-eosina para detectar larvas en los músculos.

Obtención de LI de tejido infectado por la Técnica de Digestión Artificial. Las LI viables se obtuvieron del músculo de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis* por seis semanas, las cuales al sacrificarlas, se obtuvo el tejido muscular (pierna, macetero, lengua, diafragma e intercostales) que fue molido. Se pesaron 60 gramos de carne y se colocaron en un costal de tela de tul, el cual se introdujo en un embudo de separación para ser sometida a digestión con jugo gástrico artificial, preparado con 1 litro de agua destilada conteniendo pepsina a una concentración de 10,000 UL, 3% de HCL 0.2 N (pepsina 3.5 grs. más 7 ml de HCL), manteniéndolo en incubación por 24 horas a 37 °C. Una vez digerido el músculo, se toma una muestra del fondo, mismo que es resuspendido en una solución de fosfatos (PBS) (Gibco BRL, Grand Island NY) que se coloca en un portaobjetos y se analiza al microscopio. ^[14] Si es positivo, se observan larvas moviéndose activamente (Figura 3).

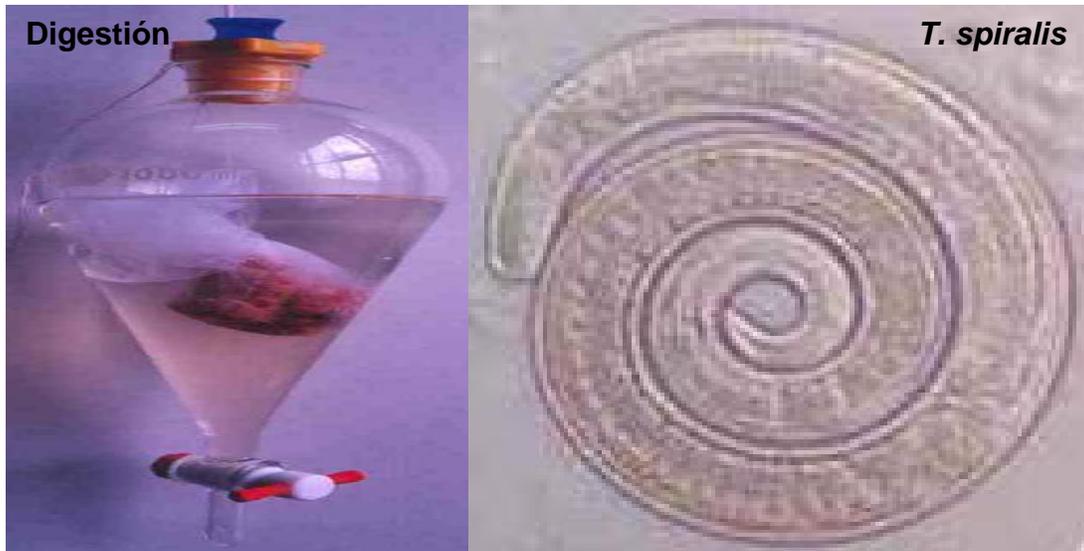


Figura 3. Procedimiento de colocación de la carne infectada en un embudo de separación conteniendo jugo gástrico artificial (Panel izquierdo). Después de 24 horas se obtienen las larvas infectantes (Panel derecho).

Ciclo Biológico de *T. spiralis*. Es conocido que el ciclo biológico de *T. spiralis* incluye tres fases, la intestinal, sistémica y muscular. Para corroborar la infección de las ratas con *T. spiralis*, se analizó el establecimiento de las larvas por medio de la técnica de digestión artificial en la fase muscular. Los hallazgos se presentan en la Figura 4.

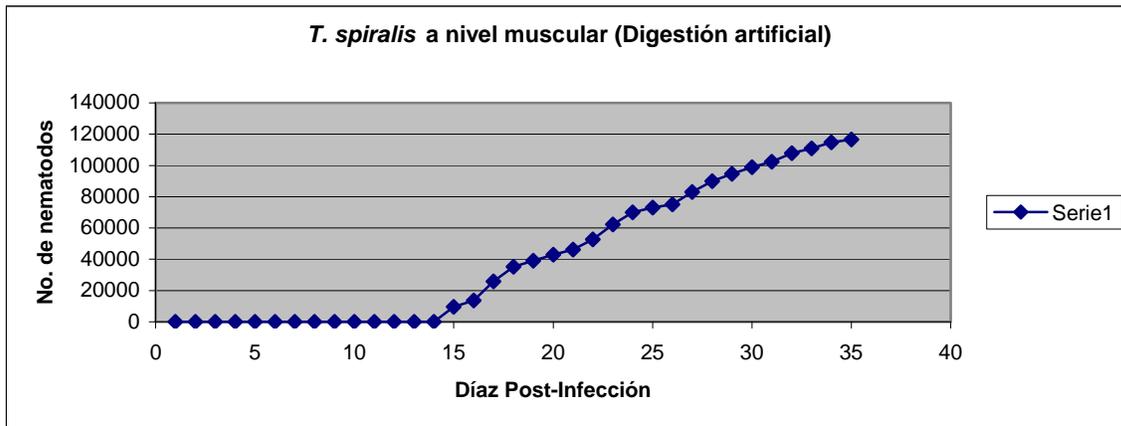


Figura 4. Conteo por el método de digestión artificial del número de nematodos en fase muscular de ratas Long Evans infectadas con *T. spiralis*. Esta técnica nos permite analizar el ciclo biológico de *T. spiralis* en un huésped.

Obtención del antígeno soluble (AS). A partir de LI obtenidas por digestión artificial de músculo estriado de rata infectada con *T. spiralis*, el paquete larvario se

lavó 3 veces con solución de fosfatos salinos (PBS; pH de 7.2)(Gibco BRL, Grand Island NY, USA, 21300-058), se le añadió una 1ml de solución de lisis que contiene: Triton X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 e inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626). En frío, las larvas con el buffer de lisis se homogenizaron. El lisado se centrifugó por 10 minutos a 1600 g y el sobrenadante fue recuperado. ^[15] A los extractos solubles obtenidos se le determinó la concentración de proteínas mediante la técnica descrita por Bradford (1976). ^[16] Este extracto sirve como antígeno para probar la respuesta inmune del huésped por las técnicas de inmunodifusión, ELISA y Wester blot.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS). Del antígeno soluble obtenido, 25 g de proteína se caracterizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS al 10%) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli (1970). ^[17]

Western Blot e inmunodetección. Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Amersham Laboratories, Buckinghamshire, England, RPN303C), como describió Towbin (1979). ^[18] Después, para identificar los antígenos contra los que están dirigidos los anticuerpos producidos por el huésped, el blot fue tratado con el suero de ratas infectadas con *T. spiralis* con una dilución 1:1000. Después, un anticuerpo anti-IgG de rata conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, A-9044) dilución 1:1500 es usado como segundo anticuerpo, seguido por un sistema de detección quimioluminiscente (ECL, RPN2106, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, England), que fue detectado en una película radiográfica BioMax (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA, 870-1302) en un tiempo de 1 minuto.

Esta técnica es de gran utilidad para evaluar la respuesta inmune de las ratas infectadas o individuos infectados con *T. spiralis*. A través de esta técnica se encuentra un reconocimiento de los determinantes antigénicos a partir del día quinto (antígeno de 67 Kd correspondiente a cutícula), mismo que correlaciona con el establecimiento de las larvas a nivel intestinal. Este reconocimiento conforme pasan los días post-infección va en aumento, detectándose con mayor claridad los antígenos de 48, 45, 42 y 32 Kd, correspondiente a la cavidad celómica del nematodo (Figura 5).

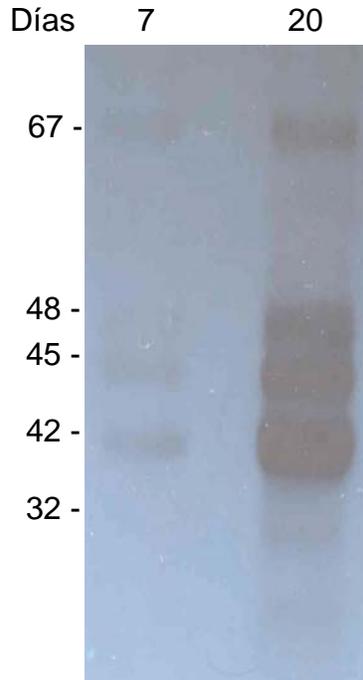


Figura 5. Respuesta inmune a la infección con *T. spiralis* en ratas Long Evans. Se encontró una respuesta a partir del día séptimo (67 Kd, correspondiente a cutícula y 48, 45, 42 y 32 Kd, correspondiente a cavidad celómica), con un incremento en el reconocimiento antigénico en el vigésimo día. Técnica de PAGE-SDS

Inmunofluorescencia: Los tejidos obtenidos de rata infectada colocados en los portaobjetos fueron lavados con PBS, bloqueados con suero fetal bovino (SFB) al 3% en PBS por 30 minutos e incubados por 1 hora con el suero de ratas infectadas con *T. spiralis*, diluido 1:500 en 3% de SFB-PBS. Después del lavado, la incubación del primer anticuerpo es seguido por el segundo anticuerpo (1:100, F-9137: FITC sheep anti-rata (Sigma Chemical Co., St Louis MO.) por 1 hora a temperatura ambiente. Después de 5 lavados con PBS, los cubreobjetos fueron montados con una mezcla de PBS-Glicerol y analizados por microscopia confocal (Carl Zeiss, Axiovert 200M).

Esta técnica nos permite analizar a *T. spiralis* en los cortes de biopsias de individuos infectados. Los nematodos van a ser fluorescentes ya que reaccionan con los anticuerpos que genera el huésped contra estos nematodos (Figura 6).

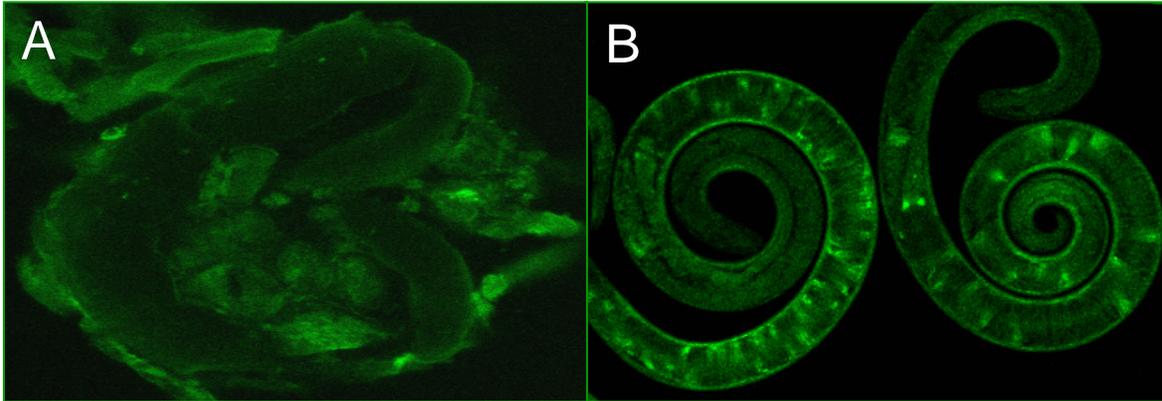


Figura 6. Inmunodetección por fluorescencia de *T. spiralis* en tejido de rata Long Evans utilizando el suero de animales infectados. Larva en corte de tejido muscular (Panel A). Larvas obtenidas de músculo de rata infectada en donde se aprecian algunas estructuras del nematodo que son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero.

Inmunodifusión doble. Esta técnica nos permite de manera rápida detectar la presencia de anticuerpos contra *T. spiralis*. Procedimiento: se preparan placas de agarosa al 0.9%, se le hacen perforaciones en forma de roseta, en los pozos se coloca al centro el antígeno obtenido de larvas de *T. spiralis* y en los periféricos los suero de los paciente en estudio (Figura 7).

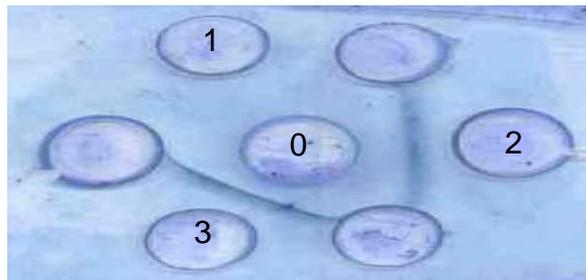


Figura 7. Apreciación de bandas reactivas o precipitantes por la técnica de inmunodifusión doble. (0) Antígeno de *T. spiralis*. (1) Suero control negativo. (2) Suero de rata infectada. (3) Suero de un paciente infectado.

CONCLUSIÓN. Existe un numero amplio de técnicas de diagnostico así como de modelos animales para el estudio de la triquinelosis. Su utilización depende de la frecuencia con que se presenta esta enfermedad, así como de un buen diagnostico que acompañado con este tipo de pruebas confirmen la presencia de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schwalbe CW. Medicina veterinaria y salud pública. México, DF: Editorial Novaro. 1969.
2. Martínez-Conde J. Guía del inspector veterinario titular. 2-Epizootiología y zoonosis. Barcelona: Biblioteca Veterinaria Aedos. 1975.
3. Owen R. description of a microscopic entozoan infesting the muscle of the human body. Trans. Zool. Soc. 1835;1:315-324.
4. Despommier D, Gwadz WR, Hotez JP. Parasitic disease. Springer Verlag. Third edition. 1994. pp. 32 – 40.
5. Despommier D. *Trichinella spiralis*. Apple Trees Productions., New York, 2004.
6. De la Rosa, JL. y Gómez A. "Trichinella y triquinosis". Ed. Mc. Graw Hill, México. 2004.
7. Bachman GW. An intradermal reaction in experimental trichiniasis. J. Prev. Med. 1928;2:513
8. Bachman GW. A precipitin test in experimental trichiniasis. J. Prev. med. 1928;2:35.
9. Ouchterlony O. Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis in: Progress Allergy. Vol. V. Ed. Gallio P Basel and New York, Krager, New York. USA. 1958. pp. 1 – 78.
10. Tizard I. Inmunología Veterinaria. Editorial Interamericana. 4ta edición. México. 1992. pp 285.
11. Gododezky LC, Escobar GA. 1994. Manual de técnicas de laboratorio. Micología parasitología e inmunología. INDRE, SSA. 1994. pp. 45 – 52.
12. Manual of Histology and special staining technical. Armed Forces, Institute of Pathology. Washington, D.C. Chapter 4. 1957. pp. 29-38
13. Reveles RG, Villalobos R, Saldivar S, Moreno MA. (1997) Implante histológico de *Trichinella spiralis*. Parasitología al Día. 21:114-118.
14. Del Río A, Herrera RM, Herrera R. Triquinosis experimental extracción de antígenos y procedimientos para detectar Anticuerpos. Archivo de investigación Medica 1986;17:359 – 367.
15. Harlow E, Lane D. Antibodies a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbord, N.Y. 1998.

16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 1970;227:680.
18. Towbin H, Staehelin T. and Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979;76:4350-54.