

Comparación de una prueba de ELISA indirecta con Digestión Artificial para diagnóstico de triquinosis en cerdos experimentalmente infectados.

Flores-Trujillo, Marcial; Salazar G. Felix y Vera L. Lino Agustín.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

INTRODUCCION

La triquinosis es una enfermedad causada por el nemátodo parásito *Trichinella spiralis*, la cual se ha encontrado en más de cien mamíferos en áreas con diferentes características geográficas y ecológicas¹. Se ha estimado que más de sesenta millones de personas en todo el mundo están infectadas con el parásito, la mayoría por ingerir carne contaminada con *Trichinella*^{2,3}. En México se han reportado varios casos de pacientes que adquieren la enfermedad por comer carne de cerdo infestada por el parásito^{4,5}, sin embargo, no hay suficientes estudios epidemiológicos en cerdos, los cuales ayudarían a un control y erradicación de la enfermedad^{6,7,8}.

La prevención de la triquinosis en el hombre debe ser resultado de adecuados programas de inspección sanitaria en los rastros y de reportes oportunos de brotes de la enfermedad, esto último para tener un control adecuado de los cerdos de traspaso que no son sacrificados en rastros y que pudieran llegar a causar triquinosis. En el valle de Toluca los cerdos de traspaso han llegado a causar la enfermedad debido a que la familia acostumbra sacrificarlos en casa y a consumir la carne ellos mismos, estos brotes ya han sido reportados por algunos autores⁹.

La posibilidad de tener éxito al examinar productos cárnicos para consumo humano depende en algunos casos de la accesibilidad del método y de lo complicado que pueda resultar su aplicación. En el caso de la triquinosis ésta se ha detectado mediante los métodos de triquinoscopia y digestión artificial, métodos directos que permiten la visualización o aislamiento del parásito¹⁰, el primero de ellos se aplica en aquellos rastros que cuentan con un triquinoscopio. Sin embargo, con el desarrollo de técnicas serológicas -las cuales son por lo general más sensibles que los métodos directos-, las posibilidades de examinar más cerdos sin necesidad de sacrificarlos se incrementan¹¹. Se ha descrito de forma particular al inmunoensayo enzimático (ELISA) como una técnica con adecuadas sensibilidad y especificidad para detectar triquinosis porcina en etapas temprana o tardía^{10,11,12}.

MÉTODOS Y MATERIALES

Las larvas de *T. spiralis spiralis* fueron mantenidas en ratones BALB/c de la Unidad de Donadores del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Las larvas obtenidas de los ratones mediante la técnica de digestión artificial se usaron para infectar a 12 cerdos híbridos (Landrace x Duroc), que fueron divididos en cuatro grupos de tres cerdos cada uno, el grupo cinco no se inoculó y se consideró como el testigo negativo, el número de larvas L₁ que se inocularon a los cuatro grupos experimentales fue de 500, 1000, 2000 y 10000 respectivamente. Cada grupo tuvo su control negativo, del mismo número de animales, por lo que el total de cerdos fue de 24. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular para obtención de suero previo a la inoculación y los días 15, 30 y 45 p.i. Las muestras fueron analizadas por duplicado mediante el método de ELISA¹³ usando antígeno somático. Todos los cerdos fueron sacrificados al día 45 p.i. tomándose muestras de músculo de los pilares del diafragma para ser sometidas a las pruebas de triquinoscopia y Digestión Artificial con una mezcla de pepsina y Hcl al 1% manteniéndola en agitación durante dos horas¹⁴.

La sensibilidad y especificidad de las dos pruebas se determinó por la prueba de hipótesis de proporciones: comparación entre dos muestras pequeñas y con corrección de Yates (Microstat versión 2.02 Ecosoft, Inc. USA). Además los resultados de la prueba de ELISA expresados en Densidad Óptica (D.O.) fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias¹⁵ (prueba de Tukey) respecto a los diferentes tiempos de muestreo por grupo inoculado.

RESULTADOS

Los resultados de la prueba de ELISA en los cerdos inoculados con 500 larvas muestran a uno de ellos como positivo en el día 45 p.i., en el grupo con 1000 dos fueron positivos al día 30 y el resto al día 45 p.i. (Cuadro 1). La D.O. se incrementó más rápido en los grupos 3 y 4 desde el día 15, mientras que en los grupos 1 y 2 se elevó hasta el día 45 p.i. (Cuadro 2).

Con la técnica de Digestión Artificial se recolectaron larvas en 6 cerdos, pertenecientes a los grupos inoculados con 2000 y 10000 larvas, mostrando ambos grupos porcentajes de infectividad de 0.34 y 0.81 respectivamente (Cuadro 3). Los resultados de sensibilidad y especificidad de ambos métodos se muestran en el Cuadro 4.

Grupo cerdo	Dosis (LPG)	ELISA				
		D. A.	Días post infección			
			0	15	30	45
1	01 500	0	-	-	-	-
	02 500	0	-	-	-	-
	03 500	0	-	-	-	-
2	04 1000	0	-	-	+	+
	05 1000	0	-	-	+	+
	06 1000	0	-	-	-	+
3	07 2000	10	-	-	-	+
	08 2000	10	-	-	+	+
	09 2000	0,1	-	-	-	+
4	10 10000	80	-	-	+	+
	11 10000	200	-	-	+	+
	12 10000	160	-	+	+	+
5 13 a 24	0	0	-	-	-	-

Resultados de ELISA y Digestión Artificial (D.A.) en cerdos infectados con 0 a 10000 larvas de *T. spiralis*.

Grupo	Número de larvas	Días post-inoculación			
		0	15	30	45
1	500	0.0773 ^a	0.0857 ^a	0.056 ^a	0.054 ^b
2	1000	0.0450 ^a	0.0633 ^a	0.158 ^b	0.221 ^b
3	2000	0.0653 ^a	0.0580 ^a	0.373 ^b	0.591 ^b
4	10000	0.0453 ^a	0.1127 ^b	0.423 ^b	0.479 ^b
5	0	0.0585 ^a	0.0558 ^a	0.056 ^a	0.059 ^a

Resultados de la Densidad Óptica en sueros con diferentes dosis de *T. spiralis* (L₁).

(P<0.05) literales por columna difieren (a,b)
X Negativo = 0.054
SD = 0.035
(0.054 + 3 (0.035)
(x-0.052) > 0.159

Cuadro 3

Grupo	n	Número de larvas inoculadas	LPG X	IL ₁ %
1	3	500	0	0
2	3	1000	0	0
3	3	2000	6.7	0.31
4	3	10000	80.66	0.81
5	12	0	0	0

Resultados de digestión artificial, larvas por gramo (LPG) e índice de larvas infectivas (IL₁) en los diferentes grupos.

Cuadro 4

Metodo	Número de cerdos examinados	Positivos	Se (%)	Sp (%)
ELISA	12	10	83.3 ^a	100.0 ^a
Digestión Artificial	12	6	50.0 ^b	100.0 ^a

Resultados de la comparación de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de ELISA y Digestión Artificial a los 45 días p.i.

(P<0.05) literales por columna difieren (a,b)
(Z₀ = 2.4354)

DISCUSION

Sin duda alguna el método de diagnóstico es un elemento importante en los programas de control y/o erradicación de las enfermedades. En el caso de la triquinosis porcina el método diagnóstico debe poseer una alta sensibilidad y especificidad.

Para detectar triquinosis existen diferentes técnicas que se basan en la detección directa del parásito en muestras de músculo esquelético o en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito en muestras de suero. Los métodos directos como la digestión artificial y la triquinoscopia son efectivos para identificar cerdos con cargas larvianas altas, teniendo la desventaja de no detectar infecciones con un número bajo de larvas, menores a 1 larva por gramo de tejido (LPG) por lo tanto tienen poca aplicación para estudios epidemiológicos confiables^{16,17}. Las pruebas serológicas resultan ser más rápidas, de bajo costo y pueden efectuarse en sangre completa o suero¹⁸. La técnica de ELISA ha sido usada para inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias, incluyendo triquinosis¹⁹. En el presente estudio ELISA fue el método de elección detectando infecciones con cargas larvianas bajas demostrando buena sensibilidad y especificidad. Mediante ELISA se detectaron anticuerpos al día 45 p.i., resultados similares a los encontrados por Yang¹⁷ y van der Leek¹⁴, comparando la técnica con digestión artificial, mientras que Smith¹⁴ encontró anticuerpos al día 72 p.i., lo cual puede ser explicado porque en infecciones leves la respuesta inmunológica es más lenta. En los grupos 2 (1000 larvas) y 3 (2000 larvas) se detectaron anticuerpos a los 30 días p.i. mientras que en el estudio de Smith¹⁴ con una infección de 1500 larvas encontró anticuerpos a los 30 días y van der Leek¹⁴ reporta valores positivos mediante ELISA a las cuatro semanas con una dosis de 5000 larvas. Estos datos demuestran que es difícil encontrar anticuerpos antes de 30 días p.i.; esto puede ser debido a que coincide con la fase de enquistamiento del parásito en el tejido muscular.

En el grupo 4 (1000 larvas) se detectaron anticuerpos a partir del día 15 p.i., lo que coincide con el trabajo de Murrell¹⁹ quien demostró que los anticuerpos son detectables dependiendo en gran parte del grado de infestación.

En este trabajo quedó demostrado que la técnica de ELISA es un método más sensible que la digestión artificial, sin embargo este último no se descartaría para el diagnóstico en animales sacrificados y que tengan una infección ≥ 1 LPG. El antígeno crudo utilizado en este trabajo es más eficaz en animales infectados a partir de 1000 larvas, pero por otra parte es más fácil y rápido en su obtención en comparación con otros antígenos como el de E-S utilizados por otros autores, no obstante el antígeno crudo pudo detectar anticuerpos contra el parásito a partir de los 45 días p.i. con dosis de 45 larvas.

Se recomienda probar este antígeno con otros, como el de E-S, y realizar estudios epidemiológicos en cerdos de explotaciones tecnificadas y de traspaso para darle una mayor validez a la técnica.

LITERATURA CITADA

- Kazacos K.R., et al. (1986) Vet. Parasitol. 19: 151-156.
- Peña, A. and Bautista, C. (1988) Vet. Mex. 19: 321-127.
- Barriga O. (1977) J. Clin. Microbiol. 6: 274-279.
- Martínez M.R. (1985) Sal. Pub. Mex. 27: 40-50.
- Martínez O.B. et al. (1986) Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 43: 181-183.
- Martínez M.R. (1979) Pren. Med. Mex. 11: 278-287.
- Martínez M.R. (1983) Sal. Pub. Mex. 25: 574-578.
- Rocha E., et al. (1986) Sal. Pub. Mex. 28: 367-378.
- Oliver D.G., et al. (1988) Agri-Practice. 6: 45-48.
- Gamble H.R., et al. (1983) Vet. Parasitol. 13: 349-364.
- Van Knapen F., et al. (1981) Vet. Parasitol. 9: 117-123.
- Yang S. (1989) Vet. Parasitol. 31: 165-171.
- Smith H.J. (1987) Can. J. Vet. Res. 51: 194-197.
- Ljunstrom I., et al. (1974) Parasitol. 69.
- Steel G.D.R. (1991) In: *Biostatística principios y procedimientos*. Mc Graw Hill.
- Knapen F., et al. (1984) Vet. Parasitol. 16: 167-171.
- Morakote N., et al. Trop. Med. and Parasitol. 42: 172-174.
- Leek V.D.M., et al. (1992) J. Parasitol. 78: 822-829.
- Murrell K.D. (1985) Exp. Parasitol. 59: 347.