

DIAGNÓSTICO *IN VIVO* DE LA TRICHINELLOSIS EN CERDOS EN UN CONTEXTO DE INDUSTRIALIZACIÓN DE PRODUCTOS Y DERIVADOS CON DENOMINACIÓN DE ORIGEN

Eliana Riva ^{1,2,*}, Cesar Fiel ¹, Gisele Bernat ^{1,2}, Pedro Steffan ¹

¹Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires de Tandil.

²Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC PBA),

* **Autor para correspondencia:** Eliana Riva, CIVETAN-CONICET-CIC PBA, Facultad de Ciencias. Veterinarias Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

eriva@vet.unicen.edu.

RESUMEN

La trichinellosis porcina en la provincia de Buenos Aires es un importante problema de salud pública que genera grandes pérdidas económicas. El inmunodiagnóstico a gran escala permitirá mejorar su prevención y control. El objetivo fue desarrollar y establecer, en nuestro laboratorio, la metodología de producción de Antígeno de Excreción/Secreción (E/S) de *Trichinella spiralis*, y validar su utilización para inmunodiagnóstico por ELISA en cerdos. Se realizaron cultivos *in vitro* de larvas musculares de *T. spiralis*, recuperadas de tejido muscular de ratones mediante digestión enzimática (DE). El producto del cultivo fue concentrado por filtración y sometido a prueba de calidad y cuantificación conservándose a -20°C. Para la validación, se utilizaron 91 muestras de suero y de tejido muscular diafragmático de cerdos asociado a un foco en 2016. Cada tejido se procesó individualmente por DE (Gold standard) determinando las larvas por gramo (lpg). Se utilizaron 10 sueros negativos para determinar el punto de corte de los sueros analizados mediante ELISA. Por DE se determinaron 12/91 muestras positivas cuyas infecciones variaron de 0,05 a 62,5 lpg. Por ELISA se determinaron 13/91 muestras positivas estableciéndose 2 falsos positivos y un falso negativo. La sensibilidad y especificidad del ELISA fue de 91,7 % y 98,1%, respectivamente. La confiabilidad de la técnica ELISA desarrollada en base al antígeno de E/S es la adecuada para emplearse como herramienta de diagnóstico *in vivo* de la trichinellosis en cerdos.

INTRODUCCION

La trichinellosis es una enfermedad transmitida por los alimentos y causada por la ingestión de larvas infectivas de *Trichinella spp.* Los animales salvajes y domésticos,

porcinos en particular, así como el hombre, pueden ser hospedadores definitivos del parásito (Murrell et al., 2000; Riva et al., 2007).

Argentina se encuentra entre los países del mundo con mayor casuística de trichinellosis en los cerdos y en el hombre (Murrell & Pozzio, 2011). Según datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, entre los años 2000 al 2010 se registró un total de 5710 casos humanos en el país, concentrándose su mayoría en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y Corrientes. Se observaron picos de la enfermedad (más de 900 casos anuales) en los años 2002 y 2003, indicándonos las repercusiones de la crisis del 2001. Anualmente se confirman alrededor de 300 casos humanos en el país. La ocurrencia de 75 brotes humanos en la provincia de Buenos Aires en los últimos 5 años, afectó a 42 partidos. En la provincia de Buenos Aires, en 10 años consecutivos (período 2001 – 2010) se han detectado un total de 429 focos porcinos afectando 87 partidos, de los cuales Tandil, Azul, Rauch, Benito Juárez, Ayacucho, Necochea y Gral. Pueyrredón figuran entre los más afectados con 20 a 34 focos por partido. En los últimos 5 años se registró un promedio de 24.3% de los partidos de la provincia de Buenos Aires con triquinosis (datos del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Pcia de Bs As).

En la actualidad el diagnóstico de la trichinellosis en cerdos se efectúa sobre muestras de tejido muscular de los animales faenados. La técnica que se utiliza es la digestión enzimática para detectar las larvas infectivas en animales portadores del parásito y es la técnica oficialmente aprobada (SENASA, Decreto N° 740/99; M.A.A. BA Disposición N° 439/99). Por ser una técnica directa, tiene alta especificidad pero su sensibilidad depende del tamaño de la muestra que se procese y del nivel de infestación por larvas en el tejido muscular. Distintos estudios indican que se pueden detectar niveles de infestación hasta 1 lpg en 5 g de tejido muscular (Gamble *et al.*, 2000) y aumentar la sensibilidad a 0,1 lpg cuando se procesan 20 g de músculo (Campbell, 1983). Esta técnica permite trabajar en escala en los mataderos y prácticamente elimina el riesgo para los consumidores de carne de cerdo procesada.

Cada vez que se diagnostica un cerdo positivo a *Trichinella*, se declara el foco de triquinosis en la granja de procedencia de los animales positivos y se procede a la interdicción con el envío a faena sanitaria de toda la población de cerdos. Esto significa la pérdida económica total para el productor, no solamente de los animales que debe enviar

a faena compulsivamente, sino también, de la inversión que eventualmente hubiera realizado. Esta situación se vuelve más dramática aún, cuando el Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires describió que más del 90% de los animales que van a faena sanitaria compulsiva procedentes de un foco, resultan luego negativos a trichinellosis.

El inmunodiagnóstico mediante ELISA utilizando antígeno de excreción/-secreción (E/S) de *T. spiralis* (Gamble *et al.*, 1983) constituyen un proceso ampliamente recomendado por la Comisión Internacional de Trichinellosis (ICT) para estudios epidemiológicos de la enfermedad y atención local de focos para determinar los niveles de riesgo de transmisión de la enfermedad en granjas porcinas (Gamble *et al.*, 2004; World Organization for Animal Health, 2008). El diagnóstico de la trichinellosis en animales vivos permite detectar y eliminar a los portadores de la enfermedad parasitaria antes que se faenen, evitando la transmisión de la parasitosis al resto de los cerdos en el sistema de producción –por canibalismo, mordedura de cola- y a los hospedadores sinantrópicos que habitualmente conviven en el ecosistema y son también potenciales transmisores de *T. spiralis*.

La confiabilidad del test ELISA en la detección de animales portadores de *T. spiralis* supera el 95% debido a que infecciones mínimas, tales como 0.01 larva/gramo de músculo pueden ser detectadas por esta técnica serológica (Gamble *et al.*, 1983) donde la calidad del Ag es fundamental. El antígeno de E/S a partir del cultivo del parásito es el que se emplea a gran escala debido a su especificidad. En Argentina, no hay proveedor de antígeno y los *Kits* de diagnóstico importados tienen un alto costo.

El presente trabajo se enmarca en el proyecto del mismo nombre que fue priorizado para la provincia de Buenos Aires por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires ante el Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECYT) en el llamado a Proyectos Federales de Innovación Productiva - Eslabonamientos Productivos Vinculados (PFIP-ESPRO VINCULADOS) 2012. El proyecto se desarrolla en 5 etapas cuya consecución final busca disminuir el impacto económico directo e indirecto de la trichinellosis en las piaras de la región con destino a la producción de chacinados y derivados de carne de cerdo en un contexto de productos con

Denominación de Origen (DOT) y contribuir a la prevención de la infección parasitaria en los consumidores.

El objetivo de esta etapa del trabajo fue desarrollar y establecer, en el Laboratorio de Trichinellosis del Área de Parasitología del SAMP, FCV UNCPBA la metodología para la producción de antígeno de E/S de *Trichinella spiralis* y utilizarlo en el inmunodiagnóstico de la enfermedad en animales.

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se obtuvieron un total de 91 muestras de suero y tejido muscular diafragmático de cerdos (lechones, cachorros y adultos) asociados a un foco producido en Carmen de Patagones en noviembre de 2016.

Cada tejido se procesó individualmente y en todos los casos posibles se analizaron 20 g por digestión enzimática (DE) (Gamble, 1996) determinándose el número de larvas por gramo de tejido analizado (lpg). La DE fue considerada la prueba Gold standard.

Los sueros fueron analizados mediante la Técnica de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) con base en antígenos de E/S de larvas musculares de *T.spiralis* (Ag E/S).

En el Laboratorio de Trichinellosis (Área de Parasitología, FCV, UNCPBA) se puso a punto el protocolo de producción y obtención de Ag E/S para su utilización en la Técnica de ELISA.

Cepa de *Trichinella* spp.

El aislamiento de *Trichinella* utilizado en este estudio fue obtenido de un cerdo naturalmente infectado asociado a un foco de trichinellosis en el 2009 y se mantuvo mediante sucesivos pasajes en ratones BALB/c en el Bioterio de la FCV-UNCPBA. La tipificación molecular de la especie *T. spiralis* fue realizada por la técnica PCR múltiple en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbrán" de Buenos Aires, Argentina.

Producción de Ag E/S de larvas musculares de *T. spiralis*

Se utilizaron 60 ratones BALB/c de 8 semanas de edad que se mantuvieron en el Bioterio de la FCV-UNCPBA bajo condiciones propuestas por PHAO/WHO. Se les administró alimento y agua *ad libitum* y un ciclo de 12 h luz/oscuridad (Cuba Caparó, 1982). Los animales fueron inoculados vía oral con aproximadamente 600 larvas musculares (LM) decapsuladas de *T. spiralis* mediante micropipeta utilizando tips descartables. Las LM fueron obtenidas por digestión enzimática de tejido muscular de ratones previamente infectados con la cepa de referencia (Gamble, 1996).

Se procedió mediante el protocolo descrito por OIE, 2012 con algunas modificaciones: A las 4 semanas post infección, los animales se sacrifican por dislocación cervical según las normas de bioética (AVMA, 2001), se retira piel y vísceras y el tejido óseo muscular completo es triturado y sometido a DE (1% pepsina 1:10000; 1% HCl 37%). Las LM recuperadas se lavan (3 veces durante 20 minutos cada vez) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado con penicilina - estreptomicina (10.000 U/10.000 µg/ml). Luego se colocaron (5.000 LM/ml) en DMEM suplementado en estufa de CO₂ al 10% y 37°C por 18 h. Se recuperó el medio de cultivo y se sometió a concentración por presión mediante filtración tangencial con membrana de retención de un peso molecular de 10.000 Da (Pellicon XL, Millipore). El volumen final recuperado se sometió a filtrado de 0,22 µm. Los antígenos E/S recuperados se fraccionan en crioviales manteniéndose a -20°C. La cuantificación de proteínas se realizó por el método Bradford (1976) y la calidad del antígeno se verificó por la presencia de bandas de 45, 49 y 53 KDa en SDS/PAGE (sulfato dodecil de sodio / electroforesis en gel de poliacrilamida).

Técnica de Enzime-Linked Immnosorbent Assay (ELISA)

Los sueros fueron analizados para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* mediante el test de ELISA: el antígeno de E/S (50 µg/ml) de LM de *T. spiralis* producido, se diluyó en buffer carbonato-bicarbonato (0.5 µg/ µl) utilizando 100 µl para sensibilizar cada pocillo de la placa. Para cada ensayo las microplacas sensibilizadas se bloquearon con 200 µl de solución tamponada de fosfatos de leche en polvo descremada (PBS-Leche 5%). Los sueros problema, controles negativos (10) y positivos se diluyeron 1:100 en buffer PBS-

leche y fueron sembrados por duplicado. Luego de una incubación a 37° C se añadió el anticuerpo anti-pig conjugado peroxidasa (Sigma) diluido 1:2500 y se incubó nuevamente a la misma temperatura. Para el revelado se realizó con *o*-phenylenediamine/ H₂O₂ en buffer citrato como sustrato incubando 10 minutos, y deteniendo la reacción con ácido sulfúrico. Los valores de densidad óptica se midieron en un Lector de ELISA (Bio-Tek) con filtro de 450 nm. El punto de corte utilizado fue calculado como el promedio de las muestras negativas más tres veces su desvío estándar.

La sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA se determinó según las siguientes fórmulas (Tarabla, 2000): Sensibilidad: $(\text{Positivos verdadero} / \text{Positivos verdaderos} + \text{Falso Negativo}) \times 100$; Especificidad: $(\text{Negativo Verdadero} / \text{Negativo verdadero} + \text{Falso Positivo}) \times 100$.

RESULTADOS

Los resultados de los análisis de las 91 muestras de tejido muscular y de suero por DE y ELISA, respectivamente, se muestran en la Tabla 1. Por DE se determinaron 12/91 muestras positivas cuyas infecciones variaron de 0,05 a 62,5 Ipg. En el test ELISA se determinaron 13/91 muestras positivas siendo el punto de corte de 0,39.

Tabla 1. Resultado de los análisis por DE y ELISA utilizando el Ag E/S de LM de *T.spiralis*. lpg: larva por gramo

N°	Digestión enzimática		ELISA	N°	Digestión enzimática		ELISA	N°	Digestión enzimática		ELISA
	lpg	Resultado	Resultado		lpg	Resultado	Resultado		lpg	Resultado	Resultado
1	0	Negativo	Negativo	31	0	Negativo	Negativo	61	6,9	Positivo	Positivo
2	0	Negativo	Negativo	32	0	Negativo	Negativo	62	0	Negativo	Negativo
3	0,15	Positivo	Positivo	33	0	Negativo	Negativo	63	0	Negativo	Negativo
4	0	Negativo	Negativo	34	0	Negativo	Negativo	64	0	Negativo	Negativo
5	0	Negativo	Negativo	35	0	Negativo	Negativo	65	0	Negativo	Negativo
6	0	Negativo	Negativo	36	0	Negativo	Negativo	66	0	Negativo	Negativo
7	0	Negativo	Negativo	37	0	Negativo	Negativo	67	0	Negativo	Negativo
8	0	Negativo	Negativo	38	0,7	Positivo	Positivo	68	0	Negativo	Negativo
9	0	Negativo	Negativo	39	62,5	Positivo	Positivo	69	0	Negativo	Negativo
10	0	Negativo	Negativo	40	0	Negativo	Negativo	70	0	Negativo	Negativo
11	0	Negativo	Negativo	41	0	Negativo	Negativo	71	0	Negativo	Negativo
12	0	Negativo	Negativo	42	0	Negativo	Negativo	72	0	Negativo	Negativo
13	0	Negativo	Negativo	43	4,8	Positivo	Positivo	73	0	Negativo	Negativo
14	0	Negativo	Negativo	44	0	Negativo	Negativo	74	0	Negativo	Negativo
15	0	Negativo	Negativo	45	0	Negativo	Negativo	75	0	Negativo	Negativo
16	0,05	Positivo	Positivo	46	0,2	Positivo	Negativo	76	0	Negativo	Negativo
17	0	Negativo	Positivo	47	0	Negativo	Negativo	77	0	Negativo	Negativo
18	0,16	Positivo	Positivo	48	0	Negativo	Negativo	78	0	Negativo	Negativo
19	0,05	Positivo	Positivo	49	0	Negativo	Negativo	79	0	Negativo	Negativo
20	0,05	Positivo	Positivo	50	0	Negativo	Negativo	80	0	Negativo	Negativo
21	0	Negativo	Positivo	51	0	Negativo	Negativo	81	0	Negativo	Negativo
22	0,05	Positivo	Positivo	52	0	Negativo	Negativo	82	0	Negativo	Negativo
23	0	Negativo	Negativo	53	0	Negativo	Negativo	83	0	Negativo	Negativo
24	0	Negativo	Negativo	54	0	Negativo	Negativo	84	0	Negativo	Negativo
25	0,60	Positivo	Positivo	55	0	Negativo	Negativo	85	0	Negativo	Negativo
26	0	Negativo	Negativo	56	0	Negativo	Negativo	86	0	Negativo	Negativo
27	0	Negativo	Negativo	57	0	Negativo	Negativo	87	0	Negativo	Negativo
28	0	Negativo	Negativo	58	0	Negativo	Negativo	88	0	Negativo	Negativo
29	0	Negativo	Negativo	59	0	Negativo	Negativo	89	0	Negativo	Negativo
30		Negativo	Negativo	60	0	Negativo	Negativo	90	0	Negativo	Negativo
								91	0	Negativo	Negativo

En la Tabla 2 se muestran la interpretación de los resultados en base a la prueba *gold standard*.

Tabla 2. Número de muestras positivas verdaderas, negativas verdaderas, falso positivas y falso negativas obtenidas por DE y ELISA

Infectado DE	Infectado ELISA		Total
	NO	SI	
NO	77	2	79
SI	1	11	12
Total	78	13	91

La sensibilidad y la especificidad calculada para el test de ELISA en base al antígeno de E/S de LM de *T. spiralis* producido y obtenido en el laboratorio de Trichinellosis fue de 91,7 % y 98,1%, respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La detección sueros positivos correspondientes a infecciones de 0,05 larvas por gramo, corrobora lo expuesto por Gamble et al. (1983) sobre confiabilidad de esta técnica para la detección de infecciones muy bajas en cerdos, indicando paralelamente, que el antígeno obtenido en el Laboratorio de Trichinellosis es de alta calidad.

El falso negativo obtenido se relaciona a la existencia del “período de ventana” en el momento de la toma de muestra. En este caso, existe infección parasitaria en el animal, pero al ser reciente, no genera una respuesta inmune suficiente para ser detectada por la técnica inmunológica. Debe tenerse en cuenta que, cuando la técnica de ELISA sea utilizada como herramienta de diagnóstico *in vivo* de la trichinellosis en cerdos, se implementará un segundo muestreo de los animales a los 30- 40 días, pudiendo entonces corroborar la negatividad de todas las muestras. Además, la técnica de ELISA se complementará con Western Blot para confirmar los animales positivos, descartando así los falsos positivos.

La alta sensibilidad y especificidad obtenida para la técnica de ELISA en base al antígeno de E/S de larvas musculares de *T. spiralis* demuestra que la misma es de confiabilidad para ser empleada en el diagnóstico *in vivo* de la trichinellosis en sueros porcinos. Esto concuerda con diversos autores que indican una mayor especificidad en el uso de

antígenos de E/S frente a los somáticos o sintéticos en la prueba de ELISA (Moller *et al.*, 2005; Zarlenga & Gamble, 1990). Haber establecido la producción de antígeno de E/S a escala en el Laboratorio de Trichinellosis permitirá a corto plazo establecer un sistema de servicio para establecimientos de producción intensiva de cerdos, basado en el monitoreo continuo a través del inmunodiagnóstico para minimizar los riesgos de transmisión de la parasitosis en el sistema de producción y su entorno.

La obtención de la Denominación de Origen Salame de Tandil – Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, Resol. 986/2011 – generó un posicionamiento especial de los productos derivados de la producción y procesamiento de la carne de cerdo, involucrando a los distintos sectores de la cadena: producción, industrialización y comercialización.

De esta manera, se logra la complementación e integración óptimos de los recursos naturales para la producción de cerdos con una fuerte cultura local y regional vinculada con la elaboración de productos artesanales e industriales derivados de su carne.

La producción primaria de cerdos es uno de los puntos críticos más importantes dado que la calidad del producto destinado al procesamiento debe acompañar el protocolo de industrialización, siendo los aspectos sanitarios fundamentales. Si bien se realiza el diagnóstico *post mortem* de la trichinellosis, la detección anticipada de anticuerpos en la sangre generaría beneficios muy significativos, dando valor agregado sanitario a la carne de cerdo que llega para procesamiento industrial.

Bibliografía

American Veterinary Medical association (AVMA)(2001). 2000 report of the AVMA panel on euthanasia. J Am Med Assoc. 218(5):669-696

Bradford, M. A. (1976). A rapid and sensitivity method for detection of binding-dye proteins. Anal. Biochem.72: 248-254.

Campbell, W.C. (1983). *Trichinella* and Trichinosis. pp 581. Campbell, W.C. (ed.).Plenum Press New York.

Cuba Caparó, A. (1982). Manual de Patología de Animales de Laboratorio. pp 173–175. In: OPS. Publicación científica y técnica 423, Washington DC.

Gamble, H.R. (1996). Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Pro.* 59, 295–298.

Gamble, H.R.; Bessonov, A.S.; Cuperlovic, K.; Gajadhar, A.A.; van Knapen, F.; Nöckler, K.; Schenone, H.; Zhu, X. (2000). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 93, 393–408.

Gamble, H.R.; Pozio E.; Bruschi, F.; Nöckler K.; Kapel C.M.; Gajadhar, A.A. (2004). International commission on trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite.* 11, 3-13.

Møller, L.N.; Petersen, E.; Gamble, R.; Kapel, C.M.O. (2005). Comparison of two antigen for demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluids of foxes, pigs and wild boars. *Vet. Parasitol.*, 132, 81-84.

Murrel, K.D.; Lichtenfels, R.; Zarlenga, D.; Pozio, E. (2000). The systematics of *Trichinella* with a key to the species. *Vet. Parasitol.* 93, 293-307.

Murrell, K.D. & Pozio, E. (2011). Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986–2009. *Emerg Infect Dis.* 17, 2194–202

Ministerio de Asuntos Agrarios, Provincia de Buenos Aires.
<http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/triquinosis.php> Fecha de acceso: marzo de 2016.

Riva, E; Steffan, PE; Fiel, CA. (2007). Trichinellosis: aspectos múltiples de una zoonosis global. En: Mejoramiento del control de la trichinellosis. FAO América Latina y el Caribe. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma 2007: 94-109

Tarabla, H. (2000). Epidemiología diagnóstica. 120p. Centro de Public. Sec. Ext. UNL. Santa Fe, Argentina.

World Organisation for Animal Health. (2008). Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *In: OIE Biological Standards Commission (Eds.), Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 34–45.

Zarlenga, D.S. y Gamble, H.R. (1990). Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 42, 165–174.