

Métodos de detección de triquinelosis en cerdos*

Methods of trichinellosis's detection in porks*

Métodos de detecção de tricinelose em porcos*

Sharon Elizabeth Cruz Estupiñan**
Ginette Isabel Chavarro Tulcán***
Martín Orlando Pulido Medellín****

Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia, Colombia

Fecha de recepción del artículo: 25 de Junio de 2017
Fecha de aceptación del artículo: 21 de Diciembre de 2017
DOI: <http://dx.doi.org/10.22335/rict.v10i1.430>

*El artículo es inscribe como parte de resultado del trabajo de investigación titulado "trichinellosis en cerdos" del semillero Grupo de investigación de Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ) de la Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia

** Medicina Veterinaria y Zootecnia. (TE). Semillero Grupo de investigación de Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ), Filiación: Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Correo electrónico: cruzsharon942@gmail.com. Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3480-5627>

***Médico Veterinario Zootecnista, UPTC. Programa Jóvenes Investigadores, Filiación. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Correo electrónico: ginette.chavarro@uptc.edu.co. orcid: <http://orcid.org/0000-0001-5321-6401>

**** MSc en Ciencias Biológicas, UPTC. Médico Veterinario, UDCA. Docente programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, filiación: Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia. Correo electrónico: mopm1@hotmail.com. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-5702-667X>

Resumen

La triquinelosis es una enfermedad parasitaria zoonótica producida por el nematodo *Trichinella spiralis* que se transmite por carnivorismo; el ciclo cerdo/hombre es el que reviste mayor importancia epidemiológica. El diagnóstico clínico de la triquinelosis en los animales es muy difícil por la ausencia de manifestaciones, sin embargo, existen métodos directos e indirectos de diagnóstico. Los

primeros se basan en el hallazgo de larvas de *Trichinella spiralis* en el tejido muscular del cerdo y los segundos se basan en la detección de la respuesta inmunológica humoral o celular en el huésped. En la presente revisión se explicarán los métodos de diagnóstico de la triquinelosis y su efectividad en el diagnóstico.

Palabras Clave: triquinelosis, métodos de diagnóstico, cerdo, zoonosis

Abstract

Trichinellosis is a zoonotic parasitic disease produced by the nematode *Trichinella Spiralis* that is transmitted by carnivorism; The pig / man cycle is the one with the highest epidemiological importance. The clinical diagnosis of trichinellosis in animals is very difficult due to the absence of manifestations, however, there are direct and indirect methods of diagnosis. The first ones are based on the finding of *Trichinella spiralis* larvae in pig muscle tissue and the second ones are based on the detection of the humoral or cellular immune

response in the host. The present review will explain the methods of diagnosis of trichinellosis and their effectiveness in diagnosis.

Keywords: trichinellosis, diagnostic methods, pigs, zoonoses

Resumo

A triquinelose é uma doença parasita zoonótica produzida pelo nematóide *Trichinella spiralis* que é transmitida pelo carnivorismo; o ciclo porco / homem é aquele com maior importância epidemiológica. O diagnóstico clínico de tricinelose em animais é muito difícil devido à ausência de manifestações, no entanto, existem métodos de diagnóstico diretos e indiretos. Os primeiros são baseados no achado de larvas de *Trichinella spiralis* no tecido muscular do porco e estes são baseados na detecção da resposta imune humoral ou celular no hospedeiro. Na presente revisão, os métodos de diagnóstico da tricinelose e sua eficácia no diagnóstico serão explicados.

Palavras-chave: Tricinelose, Métodos de Diagnóstico, Porcos, Zoonoses.

Introducción

En algunos países la triquinelosis es una enfermedad parasitaria de gran importancia tanto para la salud pública como para la economía. Es importante mencionar que es una zoonosis cosmopolita estrechamente relacionada a hábitos culturales y a la dieta ya que se transmite por carnivorismo afectando al hombre y a otros mamíferos (Valencia et al., 2003). La evaluación del estado infeccioso de las poblaciones de cerdos de cría se basa en el conocimiento de las prácticas de gestión y a los datos de los programas de seguimiento y vigilancia de los cerdos vivos o sacrificados (vigilancia serológica). También pueden usarse datos de la salud humana para apoyar la determinación del riesgo de la exposición a *Trichinella* spp. (OMS, 2015). Es por eso que en algunos países para evitar la transmisión de estos parásitos a los seres humanos se realizan pruebas en donde se analizan muestras de músculo en plantas de beneficio o de procesamiento de productos cárnicos (Pozió, 2015).

Esta detección directa se aplica también en el monitoreo de la fauna, donde los animales indicadores (por ejemplo, zorros, perros o mapaches) son examinados para evaluar la prevalencia de la infección de *Trichinella* spp entre el depósito de la fauna y el riesgo de introducción en los animales domésticos. Los métodos para detectar larvas de *Trichinella* en muestras de músculo tienen que ser muy sensibles, y el rendimiento es en gran medida influenciado por el tamaño de la muestra, el tipo muscular seleccionado para el muestreo y el método específico utilizado (Gottstein et al., 2009).

El diagnóstico clínico de la triquinelosis en los animales es muy complicado por la ausencia de manifestaciones y porque los signos no son característicos. En la especie humana la enfermedad se puede confundir clínicamente con 50 enfermedades y el diagnóstico sólo es posible en el periodo de invasión muscular, por eso cuando se presentan manifestaciones que pueden orientar a un diagnóstico presuntivo deben ser confirmadas por el laboratorio (Valenzuela, 2007).

Los métodos indirectos sugieren la presencia del parásito evidenciada por la presencia de anticuerpos específicos. Estas pruebas se basan en el reconocimiento de un antígeno de *Trichinella* spp. por parte de los anticuerpos anti-*Trichinella* formando inmunocomplejos (Ruiz et al., 2008). La detección de respuesta inmunológica -humoral o celular- en el hospedero representa una evidencia sólida del contacto con el parásito, y las técnicas desarrolladas con esa finalidad, se encuadran entre los métodos indirectos de diagnóstico (Ministerio de Salud de Chile., 2016).

Tanto los métodos directos como los indirectos sirven para el diagnóstico de esta enfermedad, es por eso que en este artículo se hará una exploración de las diferentes técnicas de diagnóstico que existen cómo se hacen y cuáles son las ventajas de cada una.

Métodos Directos de Diagnóstico

La detección directa se hace en el primer estadio larval (L1 enquistada) en tejido muscular, se realiza

en la inspección post-mortem y comprende 2 técnicas: Triquinoscopia Directa y Técnica de Digestión artificial o enzimática (Trujillo et al., 2009).

Las canales de cerdos domésticos son sometidas a muestreos sistemáticos en los mataderos en el marco de los exámenes post-mortem. Se toma una muestra de cada canal, que se analiza para detectar triquinas en un laboratorio designado por la autoridad competente (Comisión de la Comunidades Europeas., 2005).

Los músculos de interés parasitológico y los que concentran la mayor cantidad de larvas de *T. spiralis* en la especie porcina son el diafragma, la lengua, los maseteros y los intercostales. Por otro lado, se encuentran los músculos de interés comercial que también son invadidos por las larvas de *T. spiralis* y muchos de ellos se consumen crudos en forma de chacinados (bondiola, jamón, paleta) (Ribicich et al., 2011).

Triquinoscopia Directa

Es un método antiguo que aún es utilizado en zonas donde no existen laboratorios con capacidad para practicar técnicas de digestión enzimática.

El procedimiento consiste en la inspección óptica de muestras de tejido muscular que se cortan en pequeños trozos en la dirección de las fibras (Ruiz et al., 2008). Para la toma de la muestra, se extraen 45 gr de uno de los pilares del diafragma cortando el músculo en el mismo sentido de la fibra muscular, otros de los músculos más frecuentemente parasitados son los intercostales, maseteros y abdominales (Trujillo et al., 2009). Este método implica la compresión de múltiples trozos de tejido muscular de 2 x 10 mm entre dos placas de vidrio (compressorium) hasta que se vuelven translúcido, seguida de un examen al microscopio (OIE, 2008). 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 (Rodríguez & Sánchez, 2006).

El examen triquinoscópico no consigue detectar las especies de *Trichinella* no encapsuladas que infectan a animales domésticos y salvajes y a seres humanos, y no es un método adecuado de detección para una utilización estándar. El método

triquinoscópico sólo debería usarse en circunstancias excepcionales para examinar un pequeño número de animales sacrificados por semana (Comisión de la Comunidades Europeas., 2005). Además, este método se ha utilizado durante décadas, es laborioso y se dispone de datos comparativos según los cuales no es tan sensible como los ensayos de digestión también no es práctico cuando se han de probar en grandes cantidades de animales (OIE, 2008).

Digestión Artificial o Enzimática

El único procedimiento recomendado para la detección de las larvas de *Trichinella* en la carne son las pruebas de digestión enzimática. En varios países se reconoce oficialmente un cierto número de pruebas de digestión con fines comerciales. La Comisión Internacional para Triquinelosis (CIT) recomienda varias de estas pruebas, que constituyen estándares documentados en la Unión Europea, Canadá y Estados Unidos. Este método consiste en la digestión in vitro del tejido muscular con ácido clorhídrico y pepsina, seguida de la visualización microscópica y la cuantificación de las larvas del parásito (Recaverren et al., 2015).

El examen parasitológico directo puede ser positivo luego de dos semanas post-infección. En el examen de rutina de canales de cerdos en los que se emplea la digestión artificial, se recomienda procesar como mínimo un gramo y de preferencia cinco gramos de tejido para la prevención de la enfermedad (Malandrini et al., 2010). Esta técnica tiene una baja sensibilidad, ya que generalmente se analizan muestras compuestas o pools de 100 g de tejido en mataderos o de 10 g en muestras individuales en laboratorios, y no siempre el material remitido es el recomendado para cerdos domésticos (diafragma y masetero) (Recaverren et al., 2015).

Para que el examen sea más confiable se deberían tener en cuenta los siguientes puntos críticos primero debe mantenerse un sistema verificable de recolección e identificación de las muestras lo que permita la identificación inequívoca del animal positivo, segundo el líquido de digestión debe ser preparado de manera que no afecte la actividad de la pepsina, es decir, agregar al agua destilada el ácido clorhídrico y luego colocar la pepsina. Este

procedimiento evita el contacto directo del ácido sobre la pepsina. se debe mantener sobre todo el proceso la temperatura 44 a 46° C. Las temperaturas más altas traerán como resultado la inactivación de la pepsina, digestión incompleta y pobres tasas de recuperación larvaria. Las temperaturas más bajas requieren tiempos más prolongados de digestión (Ministerio de Asuntos Agrarios y Producción de Buenos Aires., 2011).

La técnica de digestión artificial rápida (DAR) se ha usado en reemplazo de la triquinoscopia y esta metodología permitió incrementar el diagnóstico de cerdos positivos en el frigorífico. La triquinoscopia puede detectar entre 3 y 10 larvas por gramo (LPG), mientras que la DAR detecta los animales parasitados con 1 a 3 LPG. Este incremento en la sensibilidad, permitió disminuir los brotes humanos al detectar una mayor proporción de animales positivos en la faena (Ribicich et al., 2011).

Métodos Indirectos de Diagnostico

Son todos los test serológicos para el diagnóstico de triquinosis, tienen la ventaja de detectar infecciones leves y se pueden realizar en el animal vivo (Trujillo et al., 2009). Estas técnicas se encuadran a la detección de la respuesta inmunológica humoral o celular en el hospedero y representan una evidencia sólida del contacto con el parásito (Ministerio de Salud de Chile., 2016). El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica es el de que un anticuerpo específico se unirá con un antígeno específico para dar un complejo anticuerpo-antígeno exclusivo (Calderón, 2007).

Antígeno

Los huéspedes de *Trichinella* spp. adquieren una sólida inmunidad dirigida contra los vermes adultos, las LRN (Larvas recién Nacidas) migrantes y las LM (Larvas Musculares). Los adultos y la actividad temprana de las LRN impactan principalmente sobre la inmunidad de la mucosa intestinal, y la circulación de las LRN en sangre o linfa y la LM, evoca una inmunidad sistémica.

Los antígenos de *T. spiralis* pertenecen a dos grupos: a) grupo I, aquellos que inducen respuesta luego de la segunda semana post-ingesta y b)

grupo II, detectados a partir de la cuarta, quinta semana post-ingesta (Riva et al., 2007). Los antígenos de los parásitos se pueden clasificar según la fuente de donde se obtienen para su estudio o aplicación clínica y su naturaleza química. (Becerril, 2014)

Los parásitos tienen ciclos de vida complejos y esta diversidad de etapas o estadios que el parásito debe completar en su ciclo vital implica un cambio estructural, bioquímico y celular que se refleja en la diversidad de antígenos que se pueden presentar de acuerdo con las diferentes etapas de desarrollo, las cuales pueden ser concurrentes en un mismo hospedero, por lo cual un parásito puede expresar diferentes antígenos de distintos estadios en un mismo hospedero. En consecuencia, la inmunidad despertada por estos antígenos por lo general es específica de estadio. Una clasificación práctica de los antígenos parasitarios de acuerdo con su origen es la siguiente: antígenos solubles extraídos del parásito (somáticos), antígenos solubles excretados o secretados, antígenos sintéticos y antígenos recombinantes (Becerril, 2014).

Obtención del antígeno soluble total de *T. Spiralis*

Con la obtención de larvas Infectantes (LI) de *T. spiralis* se someten a varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasan con acetona absoluta a evaporación y se mantienen en PBS, después se procede a sonicar con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI de *T. spiralis*, se centrifuga a 3500 rpm por 1 hora y 30 minutos; el sobrenadante contiene el antígeno soluble total (AST) que se usa como antígeno soluble total de *T. spiralis* para las diferentes pruebas en los sueros problema (Moreno et al., 2007).

Inmunofluorescencia IFI

La inmunofluorescencia indirecta es una técnica de alta sensibilidad que consiste en incubar el suero del paciente (anticuerpo) en un sustrato antigénico (células HEp- 2, hígado o riñón de rata), al cual se le añade una antiinmunoglobulina unida a un fluorocromo que permite visualizar la reacción con un microscopio de fluorescencia. Los resultados son reportados como negativos o positivos, expresando la dilución y el tipo de patrón (Munive et al., 2010).

La fluorescencia es una propiedad de ciertas moléculas que, al ser irradiadas con energía electromagnética de longitud de onda adecuada, emiten radiación de longitud de onda característica permitiendo su cuantificación. Se utiliza esencialmente en la detección de autoanticuerpos y anticuerpos contra antígenos de superficie de células y tejidos (Calderón, 2007).

La gran desventaja de este método es que es operador dependiente y la confiabilidad de los resultados está directamente relacionada con la experiencia del observador (Hayashi et al., 2001).

ELISA Indirecto

El diagnóstico se basa en un sistema en paralelo conformado por un enzima inmuno-ensayo de base sólida (ELISA) que mide anticuerpos circulantes contra antígenos de excreción y secreción como método de tamizaje (Malandrini et al., 2010). Según investigaciones recientes los anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* detectados por la prueba de ELISA, se mantienen en el cerdo durante 100 días post-infección. Debido a que las larvas comienzan a ser infectivas entre los 17 y 21 post-infección (Medina et al., 2006).

Este es el método más comúnmente utilizado para la detección de la infección por *Trichinella* spp. debido principalmente a la sensibilidad metódica que permite la detección de tan solo 1 larva por 100 g de tejido muscular (Bruno Gottstein et al., 2009). Este método se emplea sobre todo en estudios epidemiológicos. El interés en la práctica clínica se limita al diagnóstico retrospectivo cuando se desea confirmar el diagnóstico (Cañavate et al., 2009).

En los cerdos que tienen 1 o 2 larvas por gramo, solamente ELISA es 100 % efectiva para diagnosticar triquinelosis. Mientras que las pruebas Western blot y digestión artificial tienen baja sensibilidad y un valor predictivo del resultado negativo bajo en cerdos con baja carga de larvas, que dejan pasar falsos negativos para consumo (Guanera et al., 2006).

Western Blot

El Western Blot es una prueba complementaria a la técnica de digestión artificial, la primera prueba se

basa en la detección de anticuerpos, mientras que la segunda se basa en la detección del agente infectante (Frey et al., 2009).

Este método permite la detección de antígenos específicos de Triquinela y puede discriminar anticuerpos de reacción cruzada. Sin embargo, esta prueba no es aplicable para el diagnóstico de rutina, ya que requiere conocimientos técnicos que consumen tiempo, y es costoso; por lo tanto, la técnica se usa a menudo como un complemento para confirmar otras pruebas serológicas con resultados positivos en lugar de como una herramienta de rutina (Yang et al., 2016).

Técnicas de Biología Molecular

La biología molecular

Los métodos de diagnóstico existentes se basan en la observación directa de los microorganismos y en la utilización de las reacciones inmunológicas que generan en el huésped, como las intradermoreacciones, y el desarrollo de métodos de detección de anticuerpos (p. ej., prueba ELISA), hemaglutinación directa e indirecta (HA) e inmunofluorescencia (IF). Estos métodos son confiables y ofrecen valores adecuados de especificidad y sensibilidad. Sin embargo, las reacciones cruzadas producen en ocasiones errores en los diagnósticos y originan la necesidad de recurrir a varias pruebas para establecer la causa exacta de la enfermedad en cuestión. Con el surgimiento de las técnicas moleculares se alcanzaron nuevas fronteras de especificidad y se aumentó la sensibilidad de las pruebas hasta poder detectar 1/12 000 de parásito, es decir, hasta 0.025 fentogramos de DNA en una muestra de sangre (Becerril, 2014).

Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Esta es una herramienta rápida y sencilla que se ha venido aplicando en estudios epidemiológicos moleculares. Ellos proporcionan información útil sobre la naturaleza y el alcance de la diversidad genética de las poblaciones de parásitos en una ubicación geográfica específica (Jojoa, 2012). El análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción terminal es una técnica

popular de huellas digitales de alto rendimiento utilizada para monitorear los cambios en la estructura y composición de las comunidades microbianas y parasitarias (Schütte et al., 2008).

Este método en combinación con la técnica de PCR permitió la diferenciación de 9 genotipos de *Trichinella* (Nagano et al., 2003).

Actualmente el ADN es la molécula de elección como marcador molecular. Se analizó por primera vez por RFLP, pero el desarrollo de la PCR permite el uso de esta metodología poderosa para diseñar enfoques más rápidos de huellas dactilares como RAP (Amplificación aleatoria de polimorfismos) no solo el ADN se usa como marcador molecular, sino que también el ARN es uno de los más usados. Otras tecnologías de gran alcance para las huellas digitales son matrices y microarrays de ADN, ARN o péptidos, (Dorado et al., 2015). El aislamiento y la purificación del ADN es un paso clave en los estudios de biología molecular. Los métodos de extracción de ADN involucran la ruptura de la pared celular o membrana celular mediante la lisis enzimática o mecánica y, en general, requieren pasos adicionales para la obtención de ADN puro (Siachoque et al., 2010).

Amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN (RAPD)

La técnica del RAPD se basa en la amplificación de segmentos de ADN genómico mediante la tecnología de la PCR a partir de cebadores oligonucleótidos cortos, diseñados previamente al azar. El patrón de bandas que se obtiene como resultado permite conocer el polimorfismo genético entre las diferentes especies o cepas (aislamientos). La habilidad de este método de detectar variaciones al nivel genético, ha permitido estudiar daños y mutaciones en él (Monzote et al., 2009).

El RAPD no necesita de grandes cantidades de ADN, ni de un previo conocimiento genético de las especies a estudiar y permite el análisis de una gran cantidad de individuos ya que es simple, rápido y de bajo costo (Roldán et al., 2014).

Sondas de ADN

Cuando se habla de sondas de ADN o ARN se refiere a segmentos de ácido nucleico de cadena simple utilizados como anzuelos para detectar una pieza de ADN fija en un soporte o suelta dentro de una sopa de molécula (Coto, 2003).

La utilización de sondas de ADN permite un diagnóstico muy específico, pero poco sensible sin embargo se utilizan fundamentalmente para la identificación de los patógenos presentes en cualquier organismo. (Torres, 2006). Mediante la utilización de sondas específicas de ADN obtenidas de distintos genotipos de *Trichinella* se logró diferenciar algunos genotipos como: *T. spiralis* y *T. murrelli* (La Rosa & Pozio, 2000).

Polimorfismos de la conformación de las cadenas simples (SSCP)

Se incluyen entre las técnicas de secuenciación; su característica es separar ácidos nucleicos de cadena sencilla que tienen distinta secuencia. Pueden detectarse diferencias de una sola base, ya que alteran la estructura secundaria de la cadena de ADN y son visibles al analizarlos por electroforesis. Los SSCP son muy utilizados en la identificación de genotipos de individuos que difieren en su secuencia de ADN (Ríos et al., 2009). Es decir, el análisis empleando esta metodología permite comprobar la variabilidad intraespecífica entre individuos de una misma especie de *Trichinella*.

A diferencia de PCR-RFLP (Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción) es un método que no requiere enzima de restricción y gel de agarosa. El costo del diagnóstico se reduce a la mitad, es más fácil y rápido que el método PCR-RFLP. Los fragmentos amplificados son visualizados en una corrida electroforética en un gel de acrilamida a 3 °C (Klug, 2013).

Multiplex PCR

En la PCR multiplex se incorporan a la reacción de amplificación más de un par de sondas específicas para diferentes secuencias blanco. Los fragmentos generados pueden reconocerse por su tamaño o por medio de marcadores incluidos en las sondas. Entre las aplicaciones de este sistema figuran el análisis de muestras en las que hay varias moléculas blanco del mismo organismo, la confirmación de

que éste se halla presente, o bien la investigación de forma simultánea de varios patógenos, para lo cual se incluyen sondas específicas para cada microorganismo. La dificultad principal de la PCR multiplex es el diseño adecuado de los oligos con el fin de evitar interacciones inespecíficas entre ellos y reconocimientos cruzados y lograr que las ampliaciones resultantes se puedan diferenciar unas de otras (Hernández & Rodríguez, 2009).

Conclusión

La triquinosis es una zoonosis reemergente que ocasiona situaciones sanitarias y económicas significativas para las comunidades, de ahí su importancia epidemiológica. En Colombia no se ha diagnosticado esta enfermedad es por eso que es importante conocer cómo se detecta, ya que unos buenos métodos de diagnóstico mejoran notablemente el control de esta. Después de haber hecho esta revisión se concluye que aunque se han hecho unos pocos estudios en el país sobre el tema, todos los trabajos realizados sobre esta enfermedad se han basado en el diagnóstico directo del parásito usualmente con Triquinoscopia directa mediante una revisión post-mortem, este método es quizás el más antiguo y el menos eficiente por lo que los resultados de estos trabajos no son concluyentes; otros pocos estudios han usado digestión enzimática como método de detección, este es el método estándar de menor costo y recomendado por Comisión Internacional para Triquinosis (CIT), aunque es muy bueno tampoco es muy sensible, además se ha hecho en cerdos que son sacrificados en plantas de beneficio por lo que la edad de estos animales no es muy avanzada como para desarrollar la enfermedad en fase muscular por lo tanto no es detectable y los resultados son negativos. Los métodos serológicos o indirectos no se han realizado en ningún estudio, estos métodos son los más eficientes en el momento de diagnosticar la enfermedad por lo que detectan infecciones leves y además se pueden realizar en animales vivos y su costo es asequible. Finalmente, en cuanto a los métodos moleculares primero se tendrían que desarrollar los serológicos para así proceder a la realización de estos.

Referencias bibliográficas

Becerril, E. M. A. (2014). *Parasitología Médica. Mc Graw Hill Education* (Vol. 4ta Ed). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Calderón, R. V. (2007). *Inmunología*. México: Instituto de Biotecnología UNAM.

Cañavate, C., Cuadros, J., Martínez, R., & Ruiz, R. (2009). *Microbiología Ante Las Enfermedades Parasitarias Importadas. (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.)*. Madrid: Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscien-tificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia35.pdf>

Comisión de la Comunidades Europeas. (2005). Reglamento (CE) no 2075/2005 de la comisión de 5 de diciembre de 2005. Retrieved May 16, 2017, from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32005R2075>

Coto, C. (2003). Herramientas moleculares: Biotecnología. *Revista Química Viva*, 3(10) 1666–7948). Retrieved from <http://www.quimicaviva.gb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo15.htm>

Dorado, G., Unver, T., Budak, H., & Hernández, P. (2015). *Reference Module in Biomedical Sciences. Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08996-0>

Frey, C. F., Schuppers, M. E., Nöckler, K., Marinculic, A., Pozio, E., Kihm, U., & Gottstein, B. (2009). Validation of a Western Blot for the detection of anti-Trichinella spp. antibodies in domestic pigs. *Parasitology Research*, 104(6), 1269–1277. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1321-9>

Girard De Kaminsky, R. (2003). *Manual de parasitología*. (2da ed.). Tegucigalpa: Universidad Nacional Autónoma de Honduras, Ed.

Gottstein, B., Pozio, E., & Nockler, K. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 127–145. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-08>

- Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. (2009). Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 127-45, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00026-08>
- Guanera, E., Krivokapich, S., Peralta, J., Trabattoni, E., Paoletti, C., Baravalle, A., ... Molina, V. (2006). *Trichinellosis Porcina Ante-Mortem*, (3), 1-8.
- Hayashi, N., Kawamoto, T., Mukai, M., Morinobu, A., Koshiba, M., Kondo, S., Kumagai, S. (2001). Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: Comparison with immunofluorescence assay in 307 patients. *Clinical Chemistry*, 47(9), 1649-1659.
- Hernández, F., & Rodríguez, M. (2009). *Avances biotecnológicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Salud Pública de Mexico*, 51(SUPPL.3), 423-438. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000900008>
- Jojoa, S. (2012). *Detección molecular de Leishmania spp en lesiones cutáneas del personal del Ejército Nacional de Colombia expuesto en zonas endémicas*. Bogotá: Ejército Nacional
- Klug, E. (2013). *Efecto del gen halotano sobre la calidad de carne porcina*, EEUU: Printed. 1-18.
- La Rosa, G., & Pozio, E. (2000). Molecular investigation of African isolates of *Trichinella* reveals genetic polymorphism in *Trichinella nelsoni*. *International Journal for Parasitology*, 30(5), 663-667. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00007-2)
- Malandrini, J., Molina, V., Soria, C., & Pizarro, C. (2010). Detección de *Trichinellosis* con Diferentes *Metodologías*. *Ciencia Veterinaria*, 5(14), 25-34.
- Medina, M., Ramirez, A., Ochoa, M., Montes, A., Franco, C., & Marin, R. (2006). *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA. In Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*. Guadalajara: Department CUCBA.771-775
- Ministerio de Asuntos Agrarios y Producción de Buenos Aires. (2011). *Manual De Procedimientos Para La Técnica De Digestion Artificial En Frigoríficos Y Mataderos*. Buenos Aires: Subsecretaria de Asuntos Agrarios., 1-7.
- Ministerio de Salud de Chile. (2016). Resultados de diagnóstico y confirmación de laboratorio Triquinosis. Chile, 2005-2015. *Instituto de Salud de Chile*, 6(1), 1-9.
- Monzote, L., Ordeñana, R., Fraga, J., Montalvo, A., & Montano, I. (2009). Identificación de especies de *Leishmania* por la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61, 0. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602009000200013&nrm=iso
- Moreno, A., Rivas, J., De la Torre, V., & Muñoz, J. (2007). Detección de *Trichinella Spiralis* en Rata Doméstica del Basurero Municipal de Zacatecas. *Revista Electronica de Veterinaria*, 8(0), 1-8.
- Munive, R., Domínguez, J. I. S., Solís, R. G., Eugenia, M., & Botello, S. (2010). Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 57, 100-104.
- Nagano, I., Wu, Z., Nakada, T., Boonmars, T., & Takahashi, Y. (2003). Molecular cloning and characterization of a serine proteinase gene of *Trichinella spiralis*. *The Journal of Parasitology*, 89(1), 92-8. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0092:MCACOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0092:MCACOA]2.0.CO;2)
- OIE. (2008). Triquinelosis. Paris. Retrieved from www.oie.int
- OMS. (2015). Directrices para el control de *trichinella* spp., en la carne de suidos CAC/GL 86-2015 Adoptado en 2015.
- Pozio, E. (2015). *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. *Veterinary Parasitology*, 213(1-2), 46-55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.017>

Recaverren, M., Quintana, S., Scialfa, E., Viera, I., Di Gerónimo, V., & Krivokapich, S. (2015). Diagnóstico molecular de trichinella spiralis en suero de porcinos. *Revista Senasa*, 8, 20–26.

Ribicich, M., Rosa, A., Bolpe, J., Scialfa, E., Cardillo, N., Pasqualetti, M., Aronowicz, T. (2011). Avances en el estudio del diagnóstico y la prevención de la trichinellosis. In a. A. De p. Veterinaria. (Ed.), jornadas de la asociacion argentina de parasitologia veterinaria Buenos Aires asociacion argentina de parasitologia veterinaria.. 1–6..

Ríos, E., Mejía, H., & Álvarez, S. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *revista de la academia mexicana de ciencias*, 60, 5–13.

Riva, E., Steffan, P., & Fiel, C. (2007). Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. FAO. *Mejoramiento Del Control de La Trichinellosis*, 9(Lm), 94–109. Retrieved from [http://cna.inta.gov.ar/helminto/pubtriquinosis/Trichinellosis aspectos multiples.pdf](http://cna.inta.gov.ar/helminto/pubtriquinosis/Trichinellosis%20aspectos%20multiples.pdf)

Rodríguez, S., & Sánchez, B. (2006). Triquinelosis: modelo de estudio y técnicas de diagnóstico clínico. *Archivos de Medicina* ©, 2(492), 1–13.

Roldán, A., Berruecos, J., Arredondo, R., & Valencia, J. (2014). Revisión: Uso del método RAPD en la detección de polimorfismos genéticos en ovinos Review: Use of RAPD method for detecting genetic polymorphisms in sheeps Resumen Introducción. *Revista de La Facultad de Agronomía, Universidad Del Zulia*, 31, 467–492.

Ruiz, M., Castaño Zubieta, M., Schapiro, J., Martínez, M., Morici, G., Castro, M., Eddi, C.. (2008). Diagnóstico de la trichinellosis porcina. Recuperado de: [http://helminto.inta.gob.ar/pubtriquinosis/trichinelosis cerdos diagnostico.htm](http://helminto.inta.gob.ar/pubtriquinosis/trichinelosis%20cerdos%20diagnostico.htm)

Schütte, U. M. E., Abdo, Z., Bent, S. J., Shyu, C., Williams, C. J., Pierson, J. D., & Forney, L. J. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 365–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1565-4>

Siachoque, N., Jewtuchowicz, V. ., Iovannitti, M., & Mujica, M. . (2010). Amplificación del gen CAP59 en *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii* directamente a partir de una suspensión de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(0325–7541), 1–61. <https://doi.org/10.7775/rac>

Torres, J. M. (2006). Diagnóstico microbiológico de las micosis cutáneas superficiales. *Medicina Clínica*, 126, 25–29. <https://doi.org/10.1157/13097522>

Trujillo, L. M. L., Cuartas, L. M. B., & Cardona, C. J. M. (2009). *Detección de Trichinella Spiralis en Cerdos Faenados en dos Plantas de beneficio en el Municipio de Bello*. (Spanish). Detection of Trichinella Spiralis on Slaughtering Domestic Pigs from Two Slaughterhouses Located in the Municipality of Bello. (English), 4(2), 47–56. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=65786323&lang=es&site=ehost-live>

Valencia, V. C., Muñoz, A. H., & Torres, H. M. (2003). Triquinosis: Entre el temor y el deber de informar la fuente de infección. *Revista Chilena de Infectología*, 20(2), 99–103. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182003000200003>

Valenzuela, M. R. (2007). Epidemiología de la triquinelosis. *Ciencia Veterinaria*, 5(0). 278–328.

Yang, Y., Cai, Y. N., Tong, M. W., Sun, N., Xuan, Y. H., Kang, Y. J., ... Liu, M. Y. (2016). Serological tools for detection of Trichinella infection in animals and humans. *One Health*, 2, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.11.005>