

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias
Cátedra de Parasitología y Enfermedades
Parasitarias
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
PRODUCCIÓN ANIMAL (INPA)
UBA-CONICET

Caracterización de la infección por especies silvestres de
***Trichinella* en jabalíes (*Sus scrofa*)**



Doctorando: Vet. Clara Bessi
Directora: Dra. Mariana I. Pasqualetti
2023

***A mi familia por su amor y apoyo incondicional,
sin ellos nada de esta tesis hubiera sido posible.***

Agradecimientos

A mis directoras. A la *Dra. M. Mabel Ribicich*, Profesora Titular de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo. Es una fuente constante de inspiración y motivación. A la *Dra. Mariana Inés Pasqualetti*, Profesora Adjunta de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, por todo su apoyo y orientación durante mi formación todos estos años. Su tutoría y liderazgo fueron fundamentales para mi aprendizaje profesional y personal. Sus predisposiciones a escuchar y asesorarme fueron fundamentales para mi crecimiento profesional. Su dedicación y compromiso con el equipo son ejemplares. Mis sinceros agradecimientos por su dedicación y tiempo brindado.

Al *Vet. Mariano Emmanuel Ercole* por su apoyo indiscutible y gran amistad durante todos estos años. Sus contribuciones y esfuerzos han hecho posible los logros que hemos alcanzado juntos. Su creatividad y disposición para asumir desafíos han sido un gran impulso para nuestro equipo.

Al *Dr. Fernando Fariña*, por su habilidad para resolver problemas y apoyo constante.

Al *Dr. Silvio Krivokapich* por sus valiosísimas contribuciones en este trabajo y por su gran predisposición para ayudar en todo lo necesario.

A la *Esp. Vet. Tatiana Aronowicz* y *Vet. Francisco Montalvo* por su colaboración en el trabajo y amistad.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires por haberme permitido primero formarme como Veterinario, y luego poder llevar a cabo un Doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por financiar mi formación como doctorando.

A todo el personal docente y no docente de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades parasitarias de la UBA que ayudaron a la realización de esta tesis

A todos ustedes, les agradezco sinceramente su compromiso y apoyo. Han hecho que esta experiencia sea significativa y enriquecedora.

Índice

1.	Abreviaturas	6
2.	Resumen	8
3.	Introducción	11
3.1.	Ciclo biológico.....	11
3.2.	Morfología	15
3.3.	Epidemiología	16
3.3.1.	Situación en la Argentina	17
3.4.	Inmunología	20
3.4.1.	Respuesta inmune durante la fase intestinal	20
3.4.2.	Respuesta inmune durante la fase muscular	21
3.5.	Diagnóstico	22
3.5.1.	Métodos directos	22
3.5.2.	Métodos indirectos	25
3.5.3.	Métodos moleculares	27
3.6.	Puntos y métodos de control	30
4.	Hipótesis	35
5.	Objetivos	35
5.1.	General	35
5.2.	Específicos	35
6.	Materiales y métodos	37
6.1.	Agentes etiológicos	37
6.2.	Tipificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa	37
6.3.	Preparación del inóculo	37
6.4.	Manejo de los animales	38
6.5.	Revisión clínica	40
6.6.	Inoculación de los animales	41
6.7.	Extracción periódica de sangre	42
6.8.	Técnica de May-Grunwald Giemsa	44
6.9.	Técnicas coproparasitológicas	44
6.10.	Eutanasia y necropsia de los animales	45
6.11.	Digestión artificial de las muestras para el estudio del patrón de distribución de larvas en los jabalíes	47
6.12.	Evaluación de la tolerancia al congelamiento de las larvas L1 de <i>T.</i> <i>patagoniensis</i> y <i>T. pseudospiralis</i>	48
6.13.	Estudio de la dinámica de anticuerpos anti- <i>Trichinella</i>	50
6.14.	Detección temprana de larvas recién nacidas por medio de PCR en tiempo real	51
7.	Resultados	55
7.1.	Inspección clínica	55
7.2.	Ganancia de peso	55
7.3.	Recuento relativo de eosinófilos	56

7.4.	Distribución larvaria	57
7.5.	Tolerancia a la congelación	59
7.6.	Dinámica de anticuerpos	63
7.7.	Detección de larvas recién nacidas por PCR en tiempo real	64
8.	Discusión	66
8.1.	Aspectos clínicos y productivos	66
8.2.	Distribución muscular	68
8.3.	Tolerancia a la congelación de las larvas musculares	70
8.4.	Dinámica de anticuerpos	72
8.5.	PCR en tiempo real	74
9.	Conclusión	76
10.	Bibliografía	78
11.	Anexo	99

Abreviaturas

Bp	Pares de bases
CICUAL	Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CINa	Cloruro de Sodio
Cutoff	Valor de corte
Ct	Ciclo umbral
DAR	Digestión artificial rápida
d.p.i.	Día/s post infección
D.O	Densidad óptica
DS	Desvío estándar
EOG	Examen Objetivo General
ELISA	Test de inmunoadsorción enzimática
E/S	Excreción-secreción
ES5	Segmento de expansión 5
ETA	Enfermedad transmitida por alimentos
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
Fig.	Figura
H/E	Hematoxilina eosina
Hsps	Proteínas de choque térmico
ICT	Comisión Internacional de Trichinellosis
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IM	Intramuscular
IL	Interleuquina
ITS-1	Región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal 1

ITS-2	Región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal 1
L1	Larva 1
LM	Larva muscular
lpg	Larvas por gramo
LRN	Larvas recién nacidas
mm	Milímetros
mM	Milimolar
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRrt	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
p.i.	Post inoculación/ post infección
PO	Per os
RCI	Índice de capacidad reproductiva
RRE	Recuento relativo de eosinófilos
RFLP	Polimorfismo de los fragmentos de restricción
Rpm	Revoluciones por minuto
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
spp.	Especie
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
Tm	Temperatura de melting
UI	Unidades internacionales
WB	Western Blot

Resumen

La trichinellosis es una enfermedad zoonótica transmitida por el consumo de alimentos infectados con *Trichinella* spp. En Argentina la enfermedad es endémica y principalmente transmitida por cerdos, reemergente en el período 1990/2005. El diagnóstico de esta parasitosis se puede realizar por medio de métodos directos e indirectos. Dentro de los métodos de observación directa del parásito están la técnica de digestión artificial y técnicas moleculares. Mientras que los indirectos detectan la respuesta del hospedador al parásito, particularmente en cerdos se utiliza la técnica de ELISA y la misma se confirma por medio de un Western Blot. Estas metodologías se realizan ya sea para realizar estudios de prevalencias como de métodos de detección directos de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la infección aguda y crónica de la enfermedad, la susceptibilidad de especie y la respuesta inmune de jabalíes infectados experimentalmente con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*. Como también evaluar la capacidad de detección de larvas recién nacidas durante el período ventana en sueros de jabalíes y cerdos infectados con *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y *T. spiralis* por medio de la técnica de PCR en tiempo real. Para este estudio se emplearon 17 jabalíes (*Sus scrofa*) y 6 cerdos (*Sus scrofa domestica*). Los animales fueron inoculados con 20000 larvas de *T. patagoniensis* (5 jabalíes y 1 cerdo), con 20000 larvas de *T. pseudospiralis* (5 jabalíes y 2 cerdos), y con 20000 larvas de *T. spiralis* (4 jabalíes y 2 cerdos), estos animales fueron divididos en grupos en función a su especie animal y a la especie de *Trichinella* inoculada. Se mantuvieron como control 3 jabalíes y 1 cerdo. Estos animales fueron revisados periódicamente y durante la fase aguda de la enfermedad fueron pesados semanalmente. Se realizaron extracciones de sangre cada 7 días durante todo el estudio. Estas muestras de sangre se utilizaron para varios estudios paralelos. Por un lado, esto se utilizó para evaluar el recuento relativo de eosinófilos en los jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*, por medio de frotis sanguíneos. Además, se utilizó el suero obtenido de las muestras de sangre de los jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*, para determinar el título de anticuerpos mediante la técnica de ELISA, utilizándose un kit comercial "PrioCHECK *Trichinella* Ab", esto se evaluó hasta el fin de la experiencia. Por otra parte, el suero de todos los animales infectados también fue utilizado para evaluar la presencia de larvas recién nacidas (LRN) a partir de la técnica de PCR en tiempo real. Esto se midió en los jabalíes a los 7 y 14 días post infección (d.p.i.), en los cerdos infectados con *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* a los 2, 5, 9, 12 y 15 d.p.i, y en los cerdos infectados con *T. patagoniensis* a los 2, 6, 10, 12 y 15 d.p.i. Con el fin de evaluar el patrón de distribución de las larvas musculares se tomaron muestras de músculos de

interés parasitológico y comercial durante la necropsia de los jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*. Los mismos fueron: lengua, diafragma, maseteros, intercostales, porción muscular del esófago, paletas, jamones, bondiola y solomillo. Estos se analizaron por medio de la técnica de digestión artificial. A su vez, también se tomaron muestras de bondiola, jamón y paleta de los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis* para evaluar la tolerancia de las larvas musculares (LM) a la congelación. Estos músculos se sometieron a temperaturas de -18 °C durante 14 días. Las fechas de muestreo fueron 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días, y en cada fecha se digirió una muestra de cada músculo, por medio de la digestión artificial, con el fin de recuperar las larvas allí presentes y así luego inocularlas en ratones BALB/c para determinar el Índice de Capacidad Reproductiva (ICR). Ningún animal presentó signos clínicos relacionados con esta parasitosis. Durante la fase aguda de la enfermedad, no se evidenciaron diferencias en la ganancia de peso, entre los jabalíes infectados y los controles. Se evidenció un aumento en el recuento relativo de eosinófilos la primera semana p.i. en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis* y en la semana 2 p.i. en los jabalíes infectados con *T. patagoniensis*. Con respecto a la dinámica de anticuerpos, los jabalíes inoculados con *T. patagoniensis* seroconvirtieron entre las 2 – 4 semanas p.i., mientras que los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* a las 2 semanas p.i. Todos los animales, excepto los controles, se mantuvieron por encima del valor de corte durante toda la experiencia (19 semanas). Diferencias estadísticamente significativas se observaron en los valores de densidad óptica (OD) entre los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* y los inoculados con *T. patagoniensis* a las 2 semanas p.i. ($P < 0.050$). La detección temprana de LRN mostró resultados variables en función a la especie animal y la especie de *Trichinella* bajo estudio. Las muestras tomadas a los 7 d.p.i. de los jabalíes infectados con *T. spiralis* fueron positivas al ser analizadas con el cebador Rep. Estas muestras positivas presentaron un rango de Ct de $29,26 \pm 0,16$ para una muestra y de hasta $33,37 \pm 0,45$ para otra, y el Ct promedio (de las muestras positivas) fue de $31,91 \pm 1,70$. A los 14 d.p.i. no se detectó ADN de LRN en los sueros analizados. Con respecto a los cerdos infectados con *T. spiralis*, el cebador Rep no logró detectar ADN circulante en suero en ninguna fecha muestreada. El cebador 18S, no logró detectar ADN de LRN en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*, ni *T. patagoniensis* en las fechas muestreadas (7 y 14 d.p.i.). Con este cebador sólo se logró detectar ADN en una muestra a los 7 d.p.i. en un solo jabalí infectado con *T. spiralis* cuando se utilizó 1 μ l de ADN, al aumentar a 5 μ l de ADN se lograron detectar las otras 3 muestras también como positivas. La muestra realizada con 1 μ l de ADN presentó un valor de Ct promedio de $37,32 \pm 0,45$, mientras que las muestras analizadas con 5 μ l presentaron un rango de Ct de $35,13 \pm 1,02$ a $36,80 \pm 0,29$, con un Ct promedio de $36,21 \pm 1,02$. La distribución

muscular de las larvas de *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* arrojaron los siguientes resultados. *T. patagoniensis* presentó una densidad larvaria considerablemente inferior a *T. pseudospiralis*. Ambas especies de *Trichinella* mostraron predilección principalmente por la lengua y el diafragma. Seguidamente, los músculos más predilectos fueron para *T. patagoniensis* las paletas, mientras que para *T. pseudospiralis* los solomillos y bondiolas. Las cargas larvarias más altas fueron: para *T. pseudospiralis* 134,3 larvas por gramo (lpg) (en lengua y músculos intercostales) y para *T. patagoniensis* de 0,087 lpg (en la lengua). Las larvas de *T. pseudospiralis* recuperadas de los músculos sometidos al tratamiento de congelación (-18 °C) se mantuvieron viables hasta las 48 h posteriores de ser colocadas en el medio propuesto. A partir del día 4 el valor del RCI fue igual a 0 en todos los grupos musculares estudiados. Este estudio nos permite comprender cómo se desarrollan estas especies cuando afectan a jabalíes, como también nos permitieron ahondar en sus capacidades biológicas. Utilizar diversos métodos diagnósticos no sólo nos permitió evaluar cómo se desarrolla esta enfermedad, sino también nos permitió comenzar a construir nuevas estrategias diagnósticas para tratar de prevenir esta parasitosis o incluso poder llegar a su diagnóstico y tratamiento precoz.

Abstract

Trichinellosis is a zoonotic disease transmitted by the consumption of foods infected with *Trichinella* spp. In Argentina the disease is endemic and mainly transmitted by pigs, re-emerging in the period 1990/2005. The diagnosis can be made through direct and indirect methods. The artificial digestion and molecular techniques are the method of choice for the direct observation of the parasite. While the indirect ones detect the host's response to the parasite, particularly in pigs, the ELISA technique is used and it is confirmed by means of a Western Blot. These methodologies are carried out either to develop prevalence studies or direct diagnoses of this disease. The aim of this work was to study the acute and chronic infection of the disease, the species susceptibility and the immune response of wild boars experimentally infected with *T. patagoniensis* and *T. pseudospiralis*. As well as to evaluate the detection capacity of newborn larvae during the window period in sera from wild boars and pigs infected with *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* and *T. spiralis* by means of the real-time PCR technique. For this study, 17 wild boars (*Sus scrofa*) and 6 pigs (*Sus scrofa domestica*) were used. The animals were inoculated with 20,000 larvae of *T. patagoniensis* (5 wild boars and 1 pig), with 20,000 larvae of *T. pseudospiralis* (5 wild boars and 2 pigs), and with 20,000 larvae of

T. spiralis (4 wild boars and 2 pigs). These animals were divided into groups based on their animal species and the *Trichinella* species inoculated. The rest of the animals were kept as control (3 wild boars and 1 pig). These animals were checked periodically, and during the acute phase of the disease they were weighed weekly. Blood samples were taken weekly throughout the study. These samples were used for various purposes. On one hand, this was used to evaluate the relative eosinophil count in wild boars infected with *T. patagoniensis* and *T. pseudospiralis*, by means of blood smears. Moreover, the sera obtained from the blood samples of wild boars infected with *T. patagoniensis* and *T. pseudospiralis* was also used to determine the antibody titer using the ELISA technique, applying a commercial kit named "PrioCHECK *Trichinella* Ab". On the other hand, the sera of all infected animals was used to evaluate the presence of newborn larvae (NBL) using the real-time PCR technique. This was measured in wild boars' serum at 7- and 14-days post infection (d.p.i.), in pigs infected with *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* at 2, 5, 9, 12 and 15 d.p.i., and in pigs infected with *T. patagoniensis* at 2, 6, 10, 12 and 15 d.p.i. In order to evaluate the distribution pattern of the muscle larvae, samples of muscles of parasitological and commercial interest were taken during the necropsy of wild boars infected with *T. patagoniensis* and *T. pseudospiralis*. These samples were: tongue, diaphragm, masseter, intercostals, muscular portion of the esophagus, upper forelegs, upper hind limbs, pork shoulders and sirloin. These were analyzed using the artificial digestion technique. At the same time, samples of pork shoulders, upper foreleg and upper hind limbs were also taken from wild boars infected with *T. pseudospiralis* to evaluate the tolerance of muscle larvae (ML) to freezing. These muscles were subjected to temperatures of -18°C for 14 days. The sampling dates were 2, 4, 7, 9, 11 and 14 days, and on each date a sample of each muscle was digested, by artificial digestion, in order to recover the ML there, and then inoculate them in BALB/c mice to determine the Reproductive Capacity Index (ICR). No animal presented clinical signs related to this disease. During the acute phase, no differences in weight gain were evident between infected wild boars and controls. An increase in the relative eosinophil count was seen immediately after infection in wild boars infected with *T. pseudospiralis* (1 week p.i.) and at week 2 p.i. in wild boars infected with *T. patagoniensis*. Regarding antibody dynamics, wild boars inoculated with *T. patagoniensis* sero-converted between 2 – 4 weeks p.i., while wild boars inoculated with *T. pseudospiralis* at 2 weeks p.i. All animals, except controls, remained above the cut-off value throughout the experience (19 weeks). Statistically significant differences were observed in optical density (OD) values between wild boars inoculated with *T. pseudospiralis* and those inoculated with *T. patagoniensis* at 2 weeks p.i. ($P < 0.050$). The early detection of NBL showed variable results depending on the animal species and the *Trichinella* species under study.

Samples taken at 7 d.p.i. of wild boars infected with *T. spiralis* were positive when analyzed with the Rep primer. These positive samples presented a Ct range of 29.26 ± 0.16 for one sample and up to 33.37 ± 0.45 for another. and the average Ct (of the positive samples) was 31.91 ± 1.70 . At 14 d.p.i. NBL DNA was not detected in the analyzed sera. Regarding pigs infected with *T. spiralis*, the Rep primer failed to detect circulating DNA in serum on any sampled date. The 18S primer failed to detect NBL DNA in wild boars infected with *T. pseudospiralis* or *T. patagoniensis* on the sampled dates (7 and 14 d.p.i.). With this primer, DNA was only detected in a sample at 7 d.p.i. in a single wild boar infected with *T. spiralis* when 1 μ l of DNA was used, when increasing to 5 μ l of DNA the other 3 samples were also detected as positive. The sample made with 1 μ l of DNA presented an average Ct value of 37.32 ± 0.45 , while the samples analyzed with 5 μ l presented a Ct range of 35.13 ± 1.02 to 36.80 ± 0.29 , with an average Ct of 36.21 ± 1.02 . The muscle distribution of the larvae of *T. pseudospiralis* and *T. patagoniensis* gave the following results. *T. patagoniensis* had a larval density considerably lower than *T. pseudospiralis*. Both *Trichinella* species showed a predilection mainly for the tongue and diaphragm. Followed by the upper forelegs for *T. patagoniensis*, and the sirloins and pork shoulders for *T. pseudospiralis*. The highest larval loads were: for *T. pseudospiralis* 134.3 larvae per gram (lpg) (in the tongue and intercostal muscles) and for *T. patagoniensis* 0.087 lpg (in the tongue). The *T. pseudospiralis* larvae recovered from the muscles subjected to freezing treatment (-18 °C) remained viable until 48 hours after being placed in the proposed medium. From day 4 onwards, the RCI value was equal to 0 in all muscle groups studied. These results allow us to evaluate how *T. patagoniensis* behaves when it infects wild boars. This study allows us to understand how these species develop when they affect wild boars, as well as allowing us to explore their biological capabilities. Using various diagnostic methods not only allowed us to delve into how this disease develops, but also allowed us to begin to build new diagnostic strategies to reach its early diagnosis and treatment or even be able to prevent this disease.

1. Introducción:

La Trichinellosis es una enfermedad zoonótica transmitida por el consumo de alimentos infectados con *Trichinella* spp. En Argentina la enfermedad es endémica, principalmente transmitida por cerdos, y ha experimentado un resurgimiento significativo durante el período 1990-2005 (Ribicich, M., y col 2005, 2009). El parásito presenta hasta el momento diez especies y tres genotipos (Zarlenga y col., 2020). Las mismas son: *Trichinella spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella* T6, *Trichinella britovi*, *Trichinella* T8, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella* T9, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella papuae*, *Trichinella zimbabwensis*, *T. chanchalensis* y *Trichinella patagoniensis* (Pozio, 2007; Krivokapich y col., 2008; Sharma y col., 2020).

Este nematode tiene como células blanco las fibras musculares esqueléticas. Dentro de éstas, una de sus fases parasitarias, la larva L1 (L1), se enquistada y permanece por un periodo tiempo prolongado y variable. Durante este proceso, se va a desarrollar una unidad funcional que le va a permitir permanecer viable dentro del organismo hospedador. Cabe destacar que algunos genotipos tienen la capacidad de desarrollar una cápsula de colágeno que los envuelve dentro de la fibra muscular. En función a si desarrollan una cápsula de colágeno o no dentro de la fibra muscular, se clasifican en dos clados. Aquellas que se engloban dentro del clado encapsulado son: *T. spiralis* (genotipo T1), *T. nativa* (genotipo T2), *T. genotipo* T6, *T. britovi* (genotipo T3), *T. genotipo* T8, *T. murrelli* (genotipo T5), *T. genotipo* T9, *T. nelsoni* (genotipo T7), *T. chanchalensis* y *T. patagoniensis* (genotipo T12); éstas parasitan mamíferos, mientras que aquellas especies que conforman el clado no encapsulado, no sólo parasitan mamíferos, sino que también parasitan reptiles y aves (*T. pseudospiralis*, *T. papuae* (genotipo T10) y *T. zimbabwensis* (genotipo T11)). Es importante aclarar que el término “no encapsuladas”, no significa realmente que no presenten una cápsula de colágeno, sino que más bien dicha cápsula es tan fina que no se puede visualizar utilizando un microscopio óptico (Xu y col., 1997).

1.1. Ciclo biológico

Una peculiaridad del ciclo de los nematodos del género *Trichinella* es el desarrollo de dos generaciones en el mismo hospedador. Su ciclo biológico puede ser dividido en 2 fases: fase intestinal y fase parenteral (ésta última es también llamada fase de diseminación y/o fase muscular). El ciclo comienza cuando el hospedador consume carne infectada con la L1 presentes en el músculo estriado, también llamada larva

enquistada o larva muscular (LM). Estas larvas son liberadas en el estómago durante la digestión por acción de la pepsina y el ácido clorhídrico, para posteriormente dirigirse hacia el intestino delgado. Una vez en el intestino delgado, las larvas se desplazan por la superficie celular, ocasionando la muerte celular incluso de células no invadidas, debido a que se generan diversas alteraciones como pérdida de la permeabilidad, ruptura de membranas, ruptura de organelas (Li y col., 1998; Mitreva, 2006). Posteriormente, las larvas penetran el epitelio columnar a nivel de las criptas, principalmente del duodeno, y realiza cuatro mudas en aproximadamente 30 horas (h). Estos estadios permanecen dentro de este nicho multicelular (Despommier 1983, 1993). Inmediatamente después de la maduración sexual se produce la cópula dentro del nicho, iniciándose entre las 30 y 40 h post-infección (pi). A los 5 días de la fertilización, las hembras comienzan a parir larvas recién nacidas (LRN) en la mucosa de las vellosidades intestinales. Debido al desarrollo de la respuesta inmune, los adultos comienzan a ser expulsadas del nicho multicelular (Despommier, 1993). La LRN es un estadio no-intracelular y existe como un organismo que se mueve libremente dentro del lumen de los vasos sanguíneos y linfáticos (Gottstein y col., 2009). Las LRN en busca de sus células blanco, pueden invadir distintos órganos, ingresando y afectando así a diversas células e incluso destruyéndolas (Despommier, 1993). Como consecuencia de su paso por diversos órganos pueden observarse alteraciones, por ejemplo, en el corazón, cerebro, ojos, pulmones (Kocięcka, 2000). Sin embargo, el establecimiento sólo ocurrirá en el músculo esquelético en el cual ingresan activamente por medio de su estilete y de la secreción de enzimas líticas. Allí, este parásito inducirá múltiples cambios en la fibra muscular, con el fin de lograr desarrollar una unidad funcional que le permitirá persistir por períodos prolongados de tiempo dentro del hospedador. Esta unidad se denomina "célula nurse". Este proceso demora en completarse aproximadamente de 20 a 30 días (Despommier 1975, 1993; Rosa & Ribicich, 2012). Las LM por medio de sus proteínas y los productos de excreción-secreción cumplen un papel crucial en la transformación de la célula hospedadora, de hecho, se han encontrado productos de secreción en los núcleos en desarrollo de las células nurse, lo que sugiere que la larva transmite en ciertos momentos la forma por la cual se debe desencadenar la transformación en dicha célula como también estimular la angiogénesis (Despommier, 1993). Sobre el desarrollo de la célula nurse se han realizado múltiples estudios, y se cree que este desarrollo sería el resultado en parte del hospedador y en parte de la larva (Wu y col., 2008). Esto es así, ya que inicialmente su desarrollo se desencadena por el trauma que la larva genera al introducirse en la fibra muscular. Esto desencadenaría una respuesta por parte del hospedador, ya que se activarían las vías proinflamatorias, como también las células satélites de los miocitos las cuales se alinearían a la célula

parasitada, favoreciendo así la creación de un ambiente propicio para la perpetuación de esta larva (Matsuo y col., 2000; Wu y col., 2001; Wu y col., 2008). Posteriormente, la larva sería la responsable de la reestructuración de la célula parasitada al afectar directamente la evolución del ciclo celular (Jasmer 1993; Wu y col., 2008). Se han logrado detectar múltiples genes cuya expresión se ve modificada en favor al desarrollo de la célula nurse (Wu y col., 2005; Boonmars y col., 2005; Wu y col., 2008) como también para la previa activación de las células satélites (Wu y col., 2001; Boonmars y col., 2004; Wu y col., 2005).

La célula nurse mide aproximadamente 250 a 400 μm y la misma se encuentra rodeada por una red circulatoria que permite generar su propio metabolismo (Rosa & Ribicich, 2012). Esta característica es fundamental ya que la larvas musculares tiene inicialmente un crecimiento dentro de la célula nurse muy rápido, aumentando diariamente casi un 40% su volumen (Despommier y col., 1975). Dentro de la fibra muscular afectada, se evidencian múltiples cambios morfológicos y funcionales, entre ellos: pérdida de miofilamentos, alteración funcional y pérdida de las mitocondrias, hipertrofia e hiperplasia de los núcleos los cuales migran hacia el centro de la fibra muscular, aumento del retículo endoplasmático liso y rugoso y de los depósitos de colágeno alrededor de la larva, así como aumento de la expresión de dos marcadores (fosfatasa ácida y sindecan-1) y aumento de la cantidad de ADN y ARN (Steward, 1973; Jasmer y col., 1991; Despommier, 1993; Beiting y col., 2006; Rosas & Ribicich, 2012). Despommier 1993, observó que, en las fases iniciales de la fase crónica de infección, la respuesta inmune del hospedador no logra destruir esta célula nurse, lo que sugiere una respuesta de protección por parte de esta unidad funcional. Una vez constituida esta unidad funcional, la L1 puede sobrevivir dentro de la misma por períodos muy prolongados de tiempo.

1.2. Morfología

Los estadios parasitarios de este nematode son las larvas L1, L2, L3, L4, L5 o pre adulto, adultos machos y hembras, y las LRN.

La larva L1, también llamada larva muscular (LM) es la forma parasitaria que se encuentra dentro de las fibras del músculo estriado, siendo la forma infectante para todos los hospedadores. Esta larva mide 1 mm, en el caso que sea macho, y 1,4 mm la hembra (Bruschi, 2021).

El clado de especies encapsuladas se caracterizan por estar recubiertas por una cápsula de colágeno, cuya composición específica aún está bajo discusión, ya que se habla de colágeno tipo I y IV, como también de colágeno tipo IV y tipo VI (Polvere y col.,

1997), conformando así la célula “nurse”. Estas LM tienen la típica forma enroscada al ser viables, mientras que, al dejar de serlo, adoptan una forma de “C”. Además, presentan un metabolismo de tipo anaeróbico (Despommier, 1993).

Los adultos presentan dimorfismo sexual, siendo las hembras más grandes que los machos. Las hembras miden entre 2-4 mm, y los machos entre 1-1,5 mm. Como todos los estadios de este nematode, su extremo anterior es más delgado que el posterior. En su extremo anterior, se encuentra una estructura característica denominada esticosoma. Este es un órgano exocrino que rodea al esófago y con el cual está asociado. Está conformado por 45 a 55 esticocitos, células que se encargan de excretar gránulos citoplasmáticos por el esófago a través del árbol canalicular. Los gránulos secretados varían en función al estadio del parásito, pero en términos generales, su contenido está en relación a los productos de excreción-secreción del parásito, como proteínas, que desempeñan funciones importantes en la patogenia de esta enfermedad como también en la modulación en la respuesta inmune (Rosa & Ribicich, 2012; Bruschi, 2021). En cuanto a su extremo posterior, los adultos presentan las estructuras involucradas en la reproducción, como los órganos genitales y los apéndices copulatorios en los machos. Estos apéndices constan de dos mamelones copulatorios, que se utilizan para la sujeción con la hembra durante la cópula y dos pares de papilas sensoriales.

Con respecto a las LRN, estas miden entre 80 a 120 μm , y, aunque sus órganos internos están aún inmaduros, ya poseen una cutícula completamente formada.

1.3. Epidemiología

Otra particularidad que presenta este género, es que posee diversos ciclos. Por un lado, el ciclo selvático, que es aquel cuya transmisión se da entre animales carnívoros, debido a sus hábitos canibalísticos y carroñeros. Luego, se encuentra el ciclo doméstico, cuya transmisión se da entre piaras de cerdos, tanto por el consumo de carnes insuficientemente cocidas o crudas, por el consumo de basura o de carcasas de cerdos que no fueron removidas del establecimiento, como también a partir de animales sinantrópicos que viven en estrecha relación con los cerdos. Finalmente, el ciclo sinantrópico, que conecta los dos primeros ciclos, involucrando animales que están en estrecha relación con el hombre y su ambiente, como son los gatos, perros y roedores. A nivel global, un estudio reveló que la especie más encontrada fue *T. spiralis* (43,3%), seguida por *T. britovi* (41,2%), y luego por *T. nativa* (7,7%) (Feidas y col., 2014). La distribución geográfica de este género está influenciada por múltiples factores como son la relación parásito/hospedador, por evolución y filogenética propia de este género, como también por el ambiente y el accionar humano (La Rosa y col., 2012; Feidas y

col., 2014). Otros autores sugieren que esto se debe particularmente a 2 factores (Pozio, 2013): la humedad y temperatura ambiental, y al hospedador. Las condiciones ambientales facilitan la supervivencia de ciertas especies en las carcasas del hospedador, mientras que para otras especies de *Trichinella*, la respuesta inmune del hospedador y el nicho celular tendrían mayor influencia (Pozio, 2013; Feidas y col. 2014). Por este motivo, la distribución de ciertas especies es más circunscripta en comparación con otras especies (Feidas y col., 2014).

En cuanto a los hospedadores, un estudio realizado por Pozio, 2013, reveló que la familia Suidae constituye el 51,8% del total de hospedadores afectados por este nematode, seguida por la familia Canidae con un 37,1%. Además, este mismo estudio muestra que las especies encapsuladas, exceptuando *T. spiralis*, suelen tener una distribución más ininterrumpida, y no se superponen entre sí en su distribución, fenómeno que también ocurre con las no encapsuladas, pero que sí ocurre entre algunas especies encapsuladas y no encapsuladas.

1.3.1. Situación en la Argentina

En Argentina, la especie porcina y *T. spiralis* constituyen la asociación especie animal/especie parásita más frecuente y la comúnmente involucrada en la aparición de brotes humanos. Sin embargo, en la última década, los jabalíes y pumas fueron las especies más prevalentes en los focos silvestres (SENASA, 2017). Esta enfermedad a pesar de ser endémica en Argentina, se presenta en brotes, especialmente durante la época invernal, por el aumento de faenas caseras durante los meses de junio, julio y agosto para la elaboración y producción de chacinados, embutidos y salazones (SENASA, 2022).

Una de las principales causas de transmisión de este parásito entre los porcinos domésticos, es la crianza domiciliaria de cerdos con pocos o inexistentes controles sanitarios e higiénicos. Estos animales frecuentemente son alimentados con restos de alimentos y basura, y también suelen convivir en contacto estrecho o constante con roedores y animales sinantrópicos, facilitando la circulación del parásito entre sus hospedadores. En este punto cobra relevancia el diagnóstico temprano. Esto es así, ya que esta enfermedad en las personas genera un amplio cuadro sintomático que fácilmente es confundida con otras afecciones de la salud. En nuestro país, hasta el momento se han encontrado en cerdos y en animales silvestres tres especies de *Trichinella*, las mismas fueron *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis*.

En el período de 2011-2020 se registraron 557 focos de trichinellosis. De estos, un 11% involucró brotes humanos (SENASA, 2022). En nuestro país, la mayor cantidad de focos silvestres se produjo en la provincia de Neuquén y en Buenos Aires, asociados principalmente a los jabalíes (SENASA, 2022). Otro dato importante para destacar es que a partir de las carnes obtenidas de la caza se elaboran chacinados y embutidos que predisponen a la aparición de nuevos brotes. Los datos obtenidos por el SENASA muestran que en el período 2011-2020, un 94% de los focos de trichinellosis en animales silvestres corresponden a jabalíes y porcinos silvestres, y un 6% a pumas. A nivel mundial, el consumo de cerdo es la principal causa de trichinellosis, seguido por el consumo de jabalí y luego por carnívoros salvajes (Pozio, 2015; Rostami y col., 2017; Zarlenga y col., 2020).

Hasta el presente, *T. patagoniensis* ha sido detectada sólo en Argentina, específicamente en pumas (*Puma concolor*), quienes constituyen el reservorio natural de esta especie (Krivokapich y col., 2012). Diversas investigaciones, han demostrado que los gatos y ratones son más susceptibles a la infección por *T. patagoniensis* que las ratas y cerdos (Krivokapich y col., 2012; Ribicich y col., 2013). Con respecto a la ruta de infección transmamaria en ratones BALB/c, Fariña y col., 2016 demostraron que la misma, no juega un rol importante en la transmisión. A su vez, se ha demostrado que *T. patagoniensis* puede alcanzar el estadio adulto, pero no completar la fase muscular en pollos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) (Pasqualetti y col., 2014). Mientras que en cobayos (*Cavia porcellus*), se constató que *T. patagoniensis* puede completar el ciclo y actuar como un hospedador potencial del parásito (Fariña y col., 2017).

En países industrializados, en los cuales presentaban pocos casos de brotes humanos de trichinellosis, han comenzado a aumentar los casos debido al consumo de carne de jabalí y animales salvajes obtenidos mediante la caza (European Food Safety Authority, 2019; Rostami y col., 2017; Zarlenga y col., 2020).

Esta enfermedad se ha detectado en personas en al menos 55 países hasta el año 2007 (Pozio, 2007). En algunos países de Sudamérica, como Argentina y Chile, la trichinellosis es un problema de difícil solución, debido a los hábitos culturales de consumo de carne y a los factores que condicionan la presencia de la parasitosis en el ámbito rural y silvestre. Entre estos factores se incluyen, los cerdos alimentados con residuos cárnicos crudos, alimentos almacenados en forma inadecuada en la granja, la falta de remoción de animales muertos, fallas en el control de roedores, instalaciones precarias para la crianza de porcinos y una eliminación deficiente de residuos que atraen a especies animales del entorno silvestre y se dirigen al urbano en busca de alimento. En este contexto, los jabalíes son protagonistas en el ciclo biológico silvestre debido a su participación como consumidores de residuos crudos.

La ocurrencia de focos genera grandes pérdidas económicas, tanto para el Estado como para el productor. Según la resolución 555-2006-SENASA, en Argentina ante la presencia de un caso positivo, el mismo debe ser notificado al SENASA y dicho organismo debe proceder a la interdicción del establecimiento. Todos los animales del establecimiento deben ser faenados con el fin de determinar si se encuentran parasitados. En el caso de confirmarse la presencia del parásito, estos deben destinarse a decomiso y digestor, generando así grandes pérdidas económicas y productivas para el productor. Por lo tanto, es de esencial interés lograr hallar un método que posibilite la detección temprana de esta infección, previo a su llegada al músculo.

El diagnóstico molecular por medio del uso de PCR en tiempo real se basa en la amplificación de secuencias de ADN específicas, en este caso, para el nematode *Trichinella* spp. utilizando sondas fluorescentes que emiten fluorescencia que se detecta a medida que ocurre la reacción de amplificación. Esta técnica permite detectar tempranamente las distintas especies de este nematode, entre ellas, *T. britovi*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. murrelli*, *T. papuae*, *T. pseudospiralis*, *T. spiralis*, *T. zimbabwensis*, T6, T8, y T9. (Alonso y col., 2011). Es importante destacar que la detección de larvas de *Trichinella* en la carne de cerdo es un problema de salud pública en muchos países, especialmente en aquellos donde el consumo de carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida es común (OMS, 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que cada año se registran alrededor de 10,000 casos de trichinellosis en personas en todo el mundo, lo que subraya la importancia de las medidas de control y prevención para esta enfermedad (OMS, 2018; OMS, 2021). Por este motivo, la detección temprana de las LRN de *Trichinella* en cerdos resulta esencial para prevenir la propagación de la enfermedad a los seres humanos. En este contexto, varios autores coinciden en la importancia de la detección temprana de *Trichinella* spp. en animales infectados y en la utilización de técnicas de PCR en tiempo real para tal fin.

1.4. Inmunología

1.4.1. Respuesta inmune durante la fase intestinal

La respuesta inmune del hospedador comienza durante la fase intestinal. Sobre este punto se han realizado múltiples estudios que buscaron determinar cómo el hospedador se defiende ante este parásito.

Se ha observado que la expulsión de los adultos del intestino, así como la disminución en la fecundidad de las hembras, ayudan a disminuir la cantidad de futuras LM (Bruschi, 2021), incluso un estudio desarrollado por Blum y col., 2013 demostró que la tasa de eliminación de adultos hembras es mayor que la de machos. Además, la tasa de eliminación está inversamente relacionado con la dosis infectiva, es decir que ratones que fueron infectados con una mayor carga larvaria de *T. spiralis* demostraron presentar por más tiempo adultos en el intestino en comparación con aquellos que fueron infectados con una menor dosis infectiva, sugiriendo así que su tasa de expulsión fue más lenta (Wassom y col., 1984a). Incluso estos autores demostraron que los genes H-2 podrían estar relacionados con este hecho, ya que estos ayudarían en la expulsión de los adultos como también en el control de la reproducción de este parásito (Wassom y col., 1984b).

Además, McCoy, 1931, sugirió que la respuesta inmune generada en el intestino por una infección previa los protege parcialmente de reinfecciones, esto fue demostrado en un estudio que realizó en ratas infectadas con *T. spiralis*. Situación similar también fue hallada en un estudio realizado en equinos por Perret y col., 1998, en el cual no lograron detectar ADN de LRN tras la reinfección de dichos animales.

La respuesta inmune contra *Trichinella* spp. involucra numerosos mecanismos efectores que están relacionados con la especie hospedadora y con las diferencias genéticas existentes entre los parásitos (Bell, 1998). La infección ocasionada por *T. spiralis* induce una respuesta inicial Th1 durante los primeros estadios de la fase intestinal, que finalmente cambia a un fenotipo Th2 (Ishikawa y col., 1998; Helmy y Grecis, 2003). Esta respuesta, junto a los efectos de la inmunidad innata, conduce a una inflamación aguda que desencadena la expulsión de los parásitos adultos alojados en el intestino. (Knight y col., 2004). Asimismo, se ha demostrado en múltiples estudios que las células T tienen un rol preponderante en la infección primaria (Walls y col., 1973; Vallance y col., 1998).

Otros autores han demostrado que la expulsión de este parásito también se debe a cambios neuromusculares en las paredes intestinales debido al aumento del tránsito intestinal (Vallance y col., 1998). Se ha propuesto que el aumento del tránsito intestinal influye en la eliminación de los adultos (Castro y col., 1976; Vallance y col., 1997; Vallance y col., 1998, Sukhdeo y Croll, 1981). Por ejemplo, un mayor aumento de la

contractibilidad muscular del intestino se evidenció en aquellos ratones que lograron eliminar los adultos más rápidamente (Vallance y col., 1997a). Además, se observó en ratas que los leucotrienos LTC4 y el LTB4 producidos en el intestino contribuyen en la expulsión de los adultos, estos leucotrienos fueron identificados en el exudado intestinal, observándose un aumento de los mismos luego de media, una y veinte horas post infección, como también un aumento de las proteasas II de mastocitos de ratas (RMCP II) en el suero (Moqbel y col., 1987). Autores como Khan y col., 2003 y Steel y col., 2019, demostraron que un aumento de la interleuquina 9 (IL-9) y IL-17, respectivamente, generan un aumento de la contractibilidad del músculo liso del yeyuno favoreciendo así la expulsión de *T. spiralis*.

A su vez, algunas de las células involucradas en la infección primaria de *Trichinella* spp. son los mastocitos de la mucosa junto con sus productos (Bruschi, 2021) como también lo son las células caliciformes que estimulan la producción de mucina (Khan y col., 2001). La hiperplasia de estas últimas se ven estimuladas por medio de la activación de la vía de Stat 6, y esto ayuda en la eliminación de estos parásitos del intestino (Khan y col., 2001).

1.4.2. Respuesta inmune durante la fase muscular

Algunos autores han demostrado que los anticuerpos podrían brindar protección contra las LRN, sin embargo, en la mayoría de los casos, esto realmente no ocurriría ya que los anticuerpos tardarían más tiempo en formarse del que la LRN llega al músculo (Moloney y Denham, 1979; Bruschi, 2021).

En las infecciones parasitarias en ratones, se ha observado que los eosinófilos cumplen funciones opuestas, ya que a veces favorecen al hospedador mientras que en otras al parásito, a su vez, adoptan roles distintos en infecciones primarias en comparación con infecciones secundarias, así como durante la fase intestinal y en la fase muscular (Huang y Appleton, 2016). Durante la fase de invasión de las LRN al músculo los eosinófilos, con ayuda de la IL-10, estimulan el aumento de células dendríticas (CD), y cumplen un rol fundamental. Ante la ausencia de estos se ha observado que el óxido nítrico (ON), y el IN- γ , generan la muerte de gran parte de estas larvas musculares, sin embargo, esto no ocurre ante la presencia de eosinófilos (Fabre y col., 2009; Gebreselassie y col., 2012; Huang y Appleton, 2016). Estos autores sugieren que los eosinófilos actúan como reguladores inmunes ya que les permiten a las LM sobrevivir y crecer dentro de la fibra muscular, en parte, gracias a la acumulación e infiltración de células Th2 (Gebreselassie y col., 2012). Estos dos procesos también se cree que ocurren por distintos mecanismos regulatorios del sistema inmune (Bruschi, 2021). Sin

embargo, ante reinfecciones, los eosinófilos, junto con los anticuerpos que se unen a las LRN, actuarían protegiendo al hospedador ya que generan la desgranulación y muerte de estas LRN, evitando o limitando su migración hacia el músculo (Bass y Szejda., 1979; Huang, y col., 2015; Huang y Appleton, 2016).

Por otro lado, los niveles de IgG1, IgG2 e IgE se incrementan significativamente durante la infección muscular crónica, estando esto asociado con una fuerte respuesta Th2 en los linfonódulos cervicales (Denkers y col., 1991; Fabre y col., 2009; Blum y col., 2013). En los cerdos, la respuesta inmune ante la presencia de este nematode no está ampliamente estudiada como en ratones. Se cree, que mecanismos de defensa de tipo Th2 participan al igual que en ratones, ya que, en un estudio realizado por Wang y col., 2020, demostró un aumento de la IgG1 e IgG2. A su vez, otro estudio realizado por Murrell, 1985, en el cual se inocularon cerdos con distinta dosis infectiva, se evidenció que aquellos que habían sido inoculados con una mayor carga larvaria eliminaban antes los adultos del intestino, sugiriendo así que la expulsión de los adultos estaría influenciada por la carga larvaria. Además, otro estudio realizado demuestra también que los cerdos presentan gran resistencia a las reinfecciones contra *T. spiralis*, posiblemente debido a la unión de los anticuerpos a las LRN, similar a lo observado en ratones (Marti y Murrell, 1986), sin embargo, más estudios son necesarios para definir las causas de esta resistencia.

Al igual que en cerdos y ratones, en humanos también se evidencia una fuerte respuesta de tipo Th2 (Morales y col., 2002) y en otro estudio una respuesta tanto de tipo Th1 como Th2 durante la fase crónica de la enfermedad (Della Bella y col., 2017). En relación a los humanos, como ocurre en cerdos, más estudios son aún necesarios para definir en detalle cómo se desarrolla la respuesta inmune en cada etapa de la enfermedad.

1.5. Diagnóstico

1.5.1. Métodos directos

El diagnóstico de esta parasitosis se puede realizar por medio de métodos directos e indirectos. Dentro de los métodos de observación directa del parásito están la triquinoscopia y la técnica de digestión artificial. Mientras que los indirectos detectan la respuesta del hospedador al parásito, particularmente en cerdos se utiliza la técnica de ELISA y la misma se confirma por medio de un Western Blot. Estas metodologías se aplican tanto para estudios de prevalencias como para diagnósticos de esta enfermedad. Los métodos directos especialmente se realizan para detectar carnes parasitadas con este nematode, con el fin de evitar brotes humanos. La triquinoscopia

es un método de compresión que se utilizaba para visualizar las L1 que se encontraban enquistadas en la musculatura. Este método se utilizó principalmente para el diagnóstico de *T. spiralis*, especie encapsulada. Sin embargo, con el descubrimiento de las especies no encapsuladas, esta técnica prácticamente quedó en desuso por su baja sensibilidad, por ser laboriosa y permitir detectar en un número reducido de muestras, y por su incapacidad de poder detectar especies no encapsuladas (Noeckler y col., 2019). Esta técnica consistía en la visualización de muestras de los músculos específicos de predilección de este parásito, de aproximadamente 0,5 g. Estas muestras se cortaban en porciones pequeñas de 2 x 10 mm y se colocaban entre dos placas de vidrio para ser comprimidas y luego visualizadas utilizando un triquinoscopio, el cual poseía un aumento de 15 a 40X (Bruschi, 2021). No obstante, esta técnica no está habilitada para liberar carne para consumo humano, ya que al ser de menor sensibilidad (detecta 3 a 5 larvas/gramo), todas aquellas carnes con menor densidad larvaria podrían ser liberadas a consumo cuando las mismas pueden llegar a enfermar a las personas (carnes con más de 1 larva/gramo) (Bruschi, 2021). Por este motivo, el principal método diagnóstico directo es la técnica de digestión artificial. La misma se basa en imitar lo que ocurre en la digestión natural, con el fin de liberar las LM enquistadas en las fibras musculares. Esta técnica fue desarrollada por W.J. Zimmermann en 1967 (Bruschi, 2021), y tiene la ventaja que se puede utilizar para digerir muestras en pool, ahorrando así tiempos de trabajo. A su vez, tiene una mayor sensibilidad, siendo la misma de hasta 1 larva/gramo (digeriendo 5 g de músculo). La sensibilidad puede verse afectada cuando los animales presentan muy baja carga larvaria, en estos casos, se puede mejorar la sensibilidad aumentando la cantidad de músculo a digerir (Bruschi, 2021). En caso de carne de equinos y de animales silvestres, se recomienda analizar como mínimo 5 a 10 g del músculo de predilección (Bruschi, 2021). La digestión enzimática es la técnica recomendada por la Comisión Internacional de Trichinellosis (*International Commission on Trichinellosis, ICT*) para el análisis de carcasas animales, y a su vez es la técnica que debe realizarse de manera obligatoria sobre todas las carcasas/reses/carnes de cerdos en Argentina (Resolución SENASA N.º 422/2003 y 555/2006), como en otros países de la Unión Europea (Bruschi, 2021).

Un factor fundamental a la hora de realizar la técnica de digestión artificial es elegir el músculo de predilección del hospedador que se quiere analizar. Esto se debe a que el músculo más parasitado o el preferido por este parásito varía en función al hospedador en el que se encuentra (Kapel, 2000, Kapel y col., 2005). En el caso de los cerdos y jabalíes, los músculos de predilección son el diafragma y la lengua, para los equinos son el masetero y la lengua, mientras que para los zorros los músculos de los miembros

(Soule y col., 1989; Kapel y col., 1994; Kapel y col, 1995; Serrano y col., 1999; Kapel, 2000). Cuando los niveles de parasitosis son elevados, las larvas musculares se van a distribuir en la mayoría de los músculos del animal, sin embargo, cuando los niveles son bajos, estas larvas van a dirigirse principalmente hacia sus músculos de predilección. Por tanto, es de vital importancia determinar los músculos de predilección para cada especie animal, con el fin de evitar falsos negativos, principalmente ante casos de baja carga larvaria, donde la distribución de las larvas no es uniforme ni pareja en el animal.

Sitios de predilección de <i>Trichinella</i> spp. en animales infectados experimentalmente (ranking)						
	Cerdos/Jabalíes		Equinos		Zorros	
	<i>T. spiralis</i> , <i>T. nativa</i> , <i>T. britovi</i> , <i>T. nelsoni</i>	<i>T. pseudospiralis</i> (Rusia, Australia, USA)	<i>T. spiralis</i> , <i>T. britovi</i>	<i>T. pseudospiralis</i> (Rusia)	<i>T. spiralis</i> , <i>T. nativa</i> , <i>T. britovi</i> , <i>T. murrelli</i> , <i>Trichinella T6</i>	<i>T. pseudospiralis</i> (Rusia, Australia, USA)
Base de la lengua	1	2	1	3	1	9
Diafragma	2	1	3	1	3	1
Maseteros	6	3	2	2	6	7
Punta de la lengua	3	5	4	4		
Cuello	4	4	5	5	7	5
Abdomen	7	8	6	8		
Solomillo	10	7	7	6		
Garganta	5	6				
Hombro			9	7		
Músculos Intercostales	9	10	10	11		
Mandíbula superior	11	12				
Miembro anterior, superior	13	9	11	9	4	2
Miembro anterior, inferior	14	13	8	14	2	8

Miembro posterior, superior			14	10	5	4
Miembro posterior, inferior	12	11	12	15	8	6
Grupa	8	14	13	13		
Lomo	5	15	15	12	9	3

(Tabla extraída de Kapel y col., 2005. “*Muscle distribution of sylvatic and domestic Trichinella larvae in production animals and wildlife.*”) En la tabla los músculos se enumeran con un ranking en función a su sitio de predilección.

1.5.2. Métodos indirectos

Por otro lado, se encuentran los métodos indirectos de diagnóstico. Estos fundamentalmente se utilizan para estudios de vigilancia epidemiológica y prevalencia en cerdos como para conocer las áreas por donde podría estar circulando este parásito. Estas pruebas se pueden realizar a partir de muestras de sangre o suero como también a partir de jugos musculares. Este último nos permite a su vez tomar muestras de carcasas de animales muertos en el campo o áreas bajo estudio, ampliando así la cantidad de muestras que se pueden procesar y diagnosticar.

Las pruebas indirectas tienen una sensibilidad mucho mayor que la técnica de digestión artificial (Gamble y col., 2000; Kapel y Gamble, 2000; Bruschi y col., 2019). No obstante, no se emplean para determinar que una carne es apta para consumo, ya que tienen un período ventana durante el cual sus resultados serán negativos. Este período se corresponde con el tiempo que demoran en generarse los anticuerpos contra el parásito. Algunos de los posibles métodos indirectos de diagnóstico son (Bruschi y col., 2019):

- Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).
- Western Blot (WB).
- Inmunofluorescencia Indirecta (IFA).
- Enzimas Inmunohistoquímicas (EIH).

Se distinguen de 3 grandes grupos de antígenos, los antígenos somáticos (derivados del soma del parásito), los de superficie, y los de excreción/secreción (E/S), siendo los 2 últimos los de mayor relevancia. Los antígenos somáticos son menos específicos ya que presentan reacción cruzada con otros parásitos, razón por la cual la ICT no recomienda su uso (Bruschi y col., 2019). Los antígenos de superficie varían en cada

etapa (estadio de LRN, LM y adultos), probablemente para favorecer su perpetuación y adaptación a cada momento del ciclo (Ortega-Pierres y col., 1996). Los antígenos de E/S se obtienen a partir de larvas musculares de *T. spiralis*, y ofrecen múltiples ventajas en comparación a otros antígenos. Entre los más importantes, es su baja reacción cruzada contra otros patógenos parasitarios, su capacidad de detectar tanto animales como personas infectadas por este nematode, y su habilidad de identificar las distintas especies de *Trichinella*, y no sólo *T. spiralis* (ya que se mantienen los epitopes dominantes entre especies). Estos antígenos son obtenidos de larvas musculares de *T. spiralis*, lo que facilita su obtención en el laboratorio (Møller y col., 2005; Gómez-Morales y col., 2009; Davidson y col., 2009; Bruschi y col., 2019). Se ha observado, que la sensibilidad de estos antígenos es menos afectada ante muestras conservadas durante más tiempo (Davidson y col., 2009). Sin embargo, cabe destacar que el método de obtención y preparación del antígeno de E/S puede generar variaciones en el producto. Un método ampliamente utilizado fue el propuesto por Gamble, 1995, y a su vez, la ICT recomienda seguir los pasos recomendados por la OIE, en el “Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals” (OIE, 2017) para la elaboración del antígeno de E/S (Bruschi y col., 2019). Hasta el momento no está definido si estos antígenos de E/S son producto de una excreción activa del parásito o del resultado de filtración desde el soma del parásito (Hewitson y col., 2009). Por último, otra desventaja que presentan los antígenos de E/S de las LM, es que no se pueden detectar en las fases iniciales de la infección, debido a que no se encuentran presentes en todos los estadios (Bruschi, 2021).

Otra forma de clasificar a los antígenos es según el momento de detección (Bruschi, 2021). Es decir, un grupo está formado por aquellos que responden rápidamente ante una infección contra ciertos anticuerpos, y los que presentan una respuesta lenta en el tiempo. Ortega-Pierres y col., 1996, a su vez clasificó a los antígenos de *T. spiralis* en ocho grupos, del TSL-1 al TSL-8, en función a cómo son reconocidos por anticuerpos monoclonales, siendo el más relevante el TSL-1. Esta autora menciona que dicho antígeno es específico de las LM, y que además es abundante en productos de E/S y de superficie, y por sobre todo desencadena una fuerte respuesta inmune en el hospedador.

El método indirecto de detección de elección es el ELISA el cual debe ser confirmado posteriormente por WB en las personas (Dupouy-Camet y Bruschi, 2007; Bruschi y col., 2019). La técnica de ELISA tiene una sensibilidad de 0,01 larvas/gramo (Yang y col., 2016). Esta se basa en la detección de los anticuerpos por medio del uso de antígenos de excreción/secreción (ES). También, se implementa esta técnica utilizando los

antígenos TSL-1 con el fin de aumentar su especificidad (Escalante y col., 2004). El uso del WB, permite confirmar en las personas, la infección por *Trichinella* spp. debido a que diferencia específicamente antígenos TSL-1 de *Trichinella* de antígenos de reacción cruzada (Yera y col., 2003; Gamble y col., 2004; Ilic y col., 2014; Bruschi, 2021). Esta reacción cruzada se produce en parte por la presencia de epitopes evolutivos altamente conservados presentes en diversos patógenos (Radovic y col., 2012; Ilic y col., 2014). El inmunodiagnóstico cobra aún más importancia cuando se hace énfasis en el diagnóstico temprano de esta enfermedad. Este nematode desencadena una serie de síntomas, los cuales pueden ser muy variables en función al órgano que afecta y dependiendo por donde migran las LRN. Esta enfermedad no presenta síntomas ni signos patognomónicos que permitan diagnosticarla (Bruschi, 2021). Por este motivo, utilizar métodos serológicos podría permitir un diagnóstico temprano en brotes o focos aislados, de modo tal de lograr implementar así un tratamiento adecuado y precoz antes que se establezcan las LM dentro de las fibras musculares, como también lograr determinar la fuente y tratar así de contenerla. Múltiples estudios han logrado detectar antígenos, provenientes tanto de las LRN como de los adultos en unos pocos días de iniciada la infección (Nishiyama y col., 1992; Bruschi, 2021). En un estudio serológico realizado por Nishiyama y col., 1992, se han obtenido resultados más sensibles para el diagnóstico de esta enfermedad detectando antígenos por sobre anticuerpos. Sin embargo, las tasas de detección por medio de esta técnica no son elevadas, por ende, estos métodos han quedado en desuso (Bruschi, 2021). Se han comenzado a estudiar nuevos métodos de diagnóstico temprano basados en técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.5.3. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares también son consideradas métodos de diagnóstico directo de este nematode, sin embargo, merecían un apartado para ahondar en su uso.

La técnica de PCR se basa en la amplificación de una secuencia específica de ADN conocida, la cual debe estar delimitada por cebadores (secuencias cortas que se unen complementariamente al inicio y fin de la secuencia a amplificar) (Krivokapich, 2012). Para diagnosticar esta enfermedad, se recomienda el uso de la técnica de PCR multiplex, ya que esta PCR modificada permite identificar varias secuencias simultáneamente, de forma tal de diagnosticar más de una especie de *Trichinella* en la misma corrida de PCR (Pozio y Zarlenga, 2019). A través de esta técnica, se puede realizar el diagnóstico de larvas aisladas como también de muestras de pools de larvas

(Pozio y Zarlenga, 2019). Esta se basa en la amplificación de 3 secuencias repetidas de ADN ribosomal (ADNr), las cuales son:

- Espaciador transcripto interno 1 (ITS 1)
- Espaciador transcripto interno 2 (ITS 2)
- Segmento de expansión 5 (ES5)

Tanto el ITS 1 como el ITS 2 se encuentran separando genes que codifican para las subunidades ribosómicas 18S, 5.8S y 28S, y el ES5 se ubica dentro de la subunidad ribosómica 28S (Krivokapich, 2012; Pozio y Zarlenga, 2019). Para realizar esta PCR multiplex se utilizan 5 pares de secuencias cortas como cebadores, dos pares para el ITS 1, otros dos pares para el ITS 2, y un par para el ES5 (Krivokapich, 2012; Pozio y Zarlenga, 2019).

Secuencia a amplificar	Secuencia del cebador	Código del cebador
ITS 1	5'-GCT.ACA.TCC.TTT.TGA.TCT.GTT-3'	cp-II-F
	5'-AGA.CAC.AAT.ATC.AAC.CAC.AGT.ACA-3'	cp-II.R
ITS 1	5'-GCG.GAA.GGA.TCA.TTA.TCG.TGT.A-3'	cp-III-F
	5'-TGG.ATT.ACA.AAG.AAA.ACC.ATC.ACT-3'	cp-III.R
ITS 2	5'-GTG.AGC.GTA.ATA.AAG.GTG.CAG-3'	cp-IV-F
	5'-TTC.ATC.ACA.CAT.CTT.CCA.CTA-3'	cp-IV.R
ITS 2	5'-CAA.TTG.AAA.ACC.GCT.TAG.CGT.GTT.T-3'	cp-V-F
	5'-TGA.TCT.GAG.GTC.GAC.ATT.TCC-3'	cp-V.R
ES5	5'-GTT.CCA.TGT.GAA.CAG.CAG.T-3'	cp-I-F
	5'-CGA.AAA.CAT.ACG.ACA.ACT.GC-3'	cp-I.R

(Tabla extraída de Pozio y Zarlenga, 2019. “*International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping Trichinella muscle stage larvae.*”)

Inicialmente, una de las primeras técnicas moleculares empleadas para evaluar las diferencias entre las especies de *Trichinella* fue el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), por medio de la cual se podía detectar fragmentos con distinta secuencia de ADN y longitud por medio del uso de enzimas de restricción.

Dichos fragmentos luego eran teñidos y separados por medio de una corrida en un gel de agarosa, de forma tal que dichas diferencias en la longitud de los fragmentos se utilizaban para diferenciar las especies (Curran y col., 1985; Bruschi, 2021).

Otra variante de la PCR que se puede emplear para el diagnóstico de *Trichinella* spp. es la PCR en tiempo real (PCRrt). Esta técnica no sólo permite amplificar secuencias determinadas, sino que permite simultáneamente cuantificar los resultados, reduciendo el tiempo de trabajo al eliminar la necesidad de pasos posteriores de separación por geles de electroforesis. Esta técnica cuantifica la señal de fluorescencia emitida, la cual es directamente proporcional al producto amplificado por la corrida de PCR en cada ciclo de amplificación (Dorak, 2006). Para lograr esto, se deben incorporar fluoróforos en la mezcla de la reacción, los cuales pueden unirse específicamente o no a la cadena de ADN (Dorak, 2006; Krivokapich, 2012). El fluoróforo más utilizado es el SYBR® Green I (Molecular Probes/Invitrogen), que se une al surco menor del ADN y emite fluorescencia. Este es un fluoróforo de unión inespecífica a la secuencia diana de ADN de doble cadena, pero es uno de los más utilizados ya que su costo no es elevado, en comparación con otros fluoróforos, además de su facilidad de uso (Dorak, 2006). Sin embargo, los dímeros de cebadores también podrán ser detectados ya que éste detecta todas las dobles cadenas formadas, detectando así señales inapropiadas (Dorak, 2006). Por este motivo, al finalizar la PCR siempre se debe realizar una curva de disociación, para descartar la presencia de dímeros de cebadores o amplicones inespecíficos. Este análisis de disociación consiste en aumentar el gradiente de temperatura, con el fin de lograr la desnaturalización del ADN y así la liberación del SYBR® Green I y la consecuente disminución de la fluorescencia emitida al alcanzarse el punto de fusión (también conocido como T_m (temperatura de melting) a cuya temperatura el ADN es monocatenario en un 50%). El T_m de una secuencia depende del contenido de C:G, del orden de la secuencia, del largo y de la composición de la secuencia. Esto permite así detectar modificaciones en las secuencias de ADN de hasta variaciones de una sola base (Dorak, 2006; Krivokapich, 2012; Jimenez-Herdeia y col., 2020;). El máximo del valor de la curva de disociación se corresponde con el valor del T_m del producto amplificado. De esta forma, al realizar este análisis de disociación, se puede determinar si la temperatura de disociación es la esperada para dicho fragmento amplificado durante la PCR, y así verificar que no se trate de dímeros de cebadores o de amplicones inapropiados (Krivokapich, 2012). Otros fluorocromos presentes en el mercado son el EvaGreen™ (Biotium, Hayward, CA) y BOXTO (TATAA Biocenter, Gothenburg, Sweden) (Dorak, 2006). La otra manera de cuantificar los amplicones obtenidos en cada ciclo es utilizando sondas de hibridación de unión específica a la secuencia blanco. Esta sonda está marcada con fluorescencia. Una de las principales ventajas de esta

metodología es que la misma no detecta dímeros de primers que sí pueden aparecer utilizando los métodos de unión inespecíficos, como lo es el SYBR® Green I, además de no necesitar realizar el análisis de disociación. Algunas de las sondas que se encuentran en el mercado son las sondas TaqMan®, Molecular Beacons®, sondas Minor Groove Binding (MGB), sondas de Locked Nucleic Acid (LNA) (Dorak, 2006).

1.6. Puntos y métodos de control

Para prevenir la aparición de brotes de trichinellosis se debe hacer hincapié en 3 puntos de control según las recomendaciones de la ICT. El primero se relaciona con la crianza de los cerdos. El segundo en función al análisis y detección de esta parasitosis en las carnes del cerdo destinadas a consumo humano. El tercero, hace referencia a posibles métodos para inactivar este parásito en carne infectada o posiblemente infectada.

Al hablar de los métodos de prevención de esta enfermedad en relación a la crianza de cerdos destinados a consumo humano hay varios puntos a tener en cuenta (Gamble, 2015; World Organization for Animal Health, 2018; Gamble y col., 2019; Bruschi, 2021).

- Delimitar el espacio en el cual se encuentran los cerdos para prevenir el contacto con cualquier otro animal ajeno a la producción, especialmente roedores. Esto busca evitar el contacto con posibles fuentes de contagio, debido a que este parásito circula libremente entre los animales silvestres (Pozio, 2007). Por este motivo, es fundamental mantener las barreras que separan los animales destinados a consumo humano de aquellos que estén fuera del control veterinario.

- No alimentar a los cerdos con basura o restos crudos. De esta forma se evita la ingestión de posibles larvas musculares enquistadas en restos tisulares. Los cerdos deben estar alimentados con alimento balanceado específicamente formulado para ellos, no sólo para cubrir y satisfacer sus necesidades nutritivas sino para evitar posibles infecciones. A su vez, es muy importante que el alimento se mantenga en una zona específica designada para este propósito, en recipientes cerrados para no atraer roedores.

- Mantener el establecimiento limpio. Dentro de estos se abarcan varios factores relevantes. Para empezar, nunca se deben dejar en el lugar restos o cadáveres de animales, ya que los mismos podrían constituir una de las principales fuentes de contagio para los cerdos. Por otro lado, es fundamental mantener las zonas alrededor del establecimiento despejadas y limpias para prevenir la circulación de roedores. Se debe evitar que haya vegetación crecida, y se fomenta el uso de grava. La implementación de medidas de manejo de plagas es aconsejada, ya sea por medio de

trampas físicas, cebos o aquellas medidas que eviten su circulación. Asimismo, que todos los desechos y basuras también se encuentren dispuestos en contenedores cerrados en zonas alejadas de los animales.

- Evitar el ingreso de cerdos cuyo origen o medidas de producción se desconozcan. Siempre que se incorporen nuevos animales los mismos deben provenir de establecimientos con bajo riesgo a presentar esta parasitosis, y que sigan los lineamientos debidos para prevenirla.

- En producciones de animales no porcinos destinadas a consumo humano, se debe evitar alimentar a los animales con restos de carne, ya que, por ejemplo, equinos destinados a consumo humano han generado brotes en países como Italia y Francia (Ancelle, 1998; Boireau y col., 2000).

Sin embargo, muchas veces estas medidas preventivas no son posibles de llevarse a cabo, ya sea porque se trata de producciones domiciliarias, o porque la carne destinada a consumo proviene de la caza de animales salvajes. En estos casos, las medidas de prevención deben ser directamente sobre la carne que se quiere consumir. En este contexto, vuelve a ser relevante el concepto de diagnóstico directo sobre la carne, el cual se logra mediante la técnica de digestión artificial. Con esta, se buscaba determinar qué carnes son o no aptas para consumo humano. Un punto fundamental a tener en cuenta cuando uno quiere analizar una carne es tomar la muestra correcta. Múltiples estudios han demostrado que el o los músculos más afectados por este nematode, van a variar en función al hospedador en el que se encuentren. Por ejemplo, para los cerdos y jabalíes, los músculos de predilección son el diafragma y la lengua (Kapel y col., 1998; Nöckler y col., 2005; Smith, 1988; Bessi y col., 2021), mientras que para los equinos son la lengua, masetero y diafragma (Pozio y col., 1999; Gamble y col., 1996; Kapel y col., 2005), para los zorros son la lengua, miembros y diafragma (Kapel y col., 2005), para los osos la lengua, el diafragma o maseteros (Gamble y col., 2000; Bruschi, 2021) para los lobos marinos la lengua (Gamble y col., 2000) y para los cocodrilos los músculos intercostales, maseteros y lengua (EU Regulación 1375/2015; Gajadhar y col., 2019). Este aspecto es crucial, ya que por el testeo del músculo incorrecto se podrían llegar a desencadenar brotes de trichinellosis. Asimismo, cuando se realiza la digestión artificial es fundamental no sólo tomar la muestra de músculo correcta, sino ajustar también los parámetros según la especie analizada, como son por ejemplo la cantidad de músculo a digerir ya que en muchos casos la misma debe ser mayor dependiendo del hospedador como de la región de donde provenga la muestra, el tiempo de digestión o sedimentación, entre otros (Gamble y col., 2000; Malakauskas y col., 2007; European Commission, 2015; Bruschi, 2021).

En el caso de que no se haya realizado un diagnóstico directo de la carne a consumir, se recomienda llevar a cabo, por lo menos, alguno de los siguientes tratamientos para inactivar al parásito que podría estar enquistado en la musculatura.

- *Irradiación de la muestra de carne.* Esta metodología no sólo previene la infección de esta parasitosis (Brake y col., 1985; Sivinski y Switzer, 1985), sino que también impide la transmisión de otros patógenos (Dubey y Thayer, 1994; Murrell y Dubey, 1993; Wikerhauser y col., 1993; Flores-Pérez y col., 2003). Varios autores han afirmado que el uso de la irradiación afecta a nivel de las gónadas de los adultos, comprometiendo su capacidad reproductiva y evitando que estos puedan generar una posterior infección muscular en el hospedador (Alicata, 1951; Alicata y Burr, 1949; Gibbs y col., 1961; Gould y col., 1957). Investigaciones recientes llevadas a cabo por Ercole y col., 2020, demostraron que con una dosis de entre 0.32 – 0.41 kGy era suficiente para inactivar la capacidad infectiva de *T. spiralis* y de una especie no encapsulada como *T. pseudospiralis*. Aunque está demostrado que el uso de la irradiación no afecta las características organolépticas de la carne (World Health Organization, 1989; Lee y col., 1996; Farkas, 1998), este método de inactivación no ha sido totalmente aceptado por los consumidores (Bruschi, 2021).

- *Cocción de la carne.* Para esto se debe monitorear tanto la temperatura como el tiempo de cocción, idealmente del centro de la carne. Se pueden tomar como referencia el cambio de color y textura de la carne como indicadores a tener también en cuenta a la hora de cocinar la carne (Gamble y col., 2000). Las larvas de *Trichinella* spp. mueren a una temperatura aproximada de 53 a 55 °C, sin embargo, se indica usar temperaturas más elevadas generalmente a la hora de cocinar carnes, con el fin de suplir la falta de homogeneidad del calor en la carne durante la cocción (Bruschi, 2021). El uso del microondas no está recomendado, ya que los resultados obtenidos tras este método de cocción no siempre garantizan la inactivación de las larvas musculares (Ribicich y col., 2004; Noeckler y col., 2019; Bruschi, 2021). A continuación, se plasma un cuadro obtenido de Noeckler y col., 2019 (*“International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of Trichinella in food animals. Food and Waterborne Parasitology Volume 14, March 2019,”*), con referencias recomendadas de temperaturas y tiempos de cocción para lograr inactivar las LM.

grados centígrados	TIEMPO MÍNIMO
49,0	21 h

50,0	9.5 h
51,1	4.5 h
52,2	2 h
53,4	1 h
54,5	30 min
55,6	15 min
56,7	6 min
57,8	3 min
58,9	2 min
60,0	1 min
61,1	1 min
62,2	Instantáneo

(Tabla extraída de Noeckler y col., 2019. “*International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of Trichinella in food animals*”.)

- *Congelación de las carnes de cerdo.* Bajo parámetros de temperatura y tiempo controlados, la congelación de la carne puede ser un método eficiente de inactivación de las LM, siempre y cuando las mismas se correspondan con larvas de *T. spiralis* (Kotula y col., 1990; Gamble y col., 2000; European Commission, 2015; Noeckler y col., 2019). La resistencia de las LM al congelamiento está influenciada por la especie de *Trichinella* involucrada, la especie animal hospedadora, la edad de las larvas musculares, la temperatura y el tiempo de congelamiento (Pozio y col., 1994). Por lo tanto, la temperatura y tiempo necesario para lograr la inactivación de las larvas musculares en gran medida va a variar según la especie de *Trichinella* involucrada, como del hospedador, ya que algunas son resistentes a la congelación, como *T. nativa*, *T. britovi* y el genotipo T6 (Gamble y col., 2000; Pozio y col., 2006; Noeckler y col., 2019). Por ende, a la hora de decidir implementar esta técnica como método de inactivación, se debe considerar la región geográfica en que se encuentran las carnes a tratar, para evaluar el riesgo en función a las especies de *Trichinella* circulantes, como también al

hospedador, ya que ciertas especies de *Trichinella* tienen más afinidad por ciertos hospedadores que por otros (Pozio y col., 2006; Bruschi, 2021). Autores como Lacour y col., 2013 determinaron que las muestras de carne de jabalíes infectados con *T. spiralis* y *T. britovi* congeladas durante 19, 30 y 56 horas mantenían la capacidad infectante pero no así, las muestras congeladas por 1-2 semanas.

- El *curado o ahumado*. El curado o ahumado de las carnes para generar subproductos cárnicos es una técnica ampliamente utilizada en nuestro país para producir salames, chacinados y embutidos. Sin embargo, la misma no garantiza la inactivación de las larvas musculares de *Trichinella* spp. Esto es así, ya que los métodos por los cuales se logran estos procesos son muy variables (Bruschi, 2021). Algunos procesos aceptados están determinados en las regulaciones establecidas por Departamento de Agricultura de los EE. UU. en la guía CFR.318.10. (USDA, 2018). Actualmente no se ha podido establecer algún proceso con pasos claros que permitan inactivar y demostrar la falta de infectividad o muerte de las LM (Bruschi, 2021). Por este motivo, no se recomienda ni el curado ni el ahumado de carnes como método efectivo para controlar esta enfermedad en carnes de cerdo, jabalí, caballo ni carnes de caza (a menos que dicho proceso haya sido correctamente validado) (Gamble y col., 2000; Noeckler y col., 2019).

A la hora de tratar de prevenir casos humanos de esta parasitosis hay que hacer un profundo trabajo sobre la población. Por medio de la concientización y educación de la gente se debe buscar iniciar la prevención de esta enfermedad. Algunas de las medidas que se les deberían enseñar pueden ser las establecidas por Gamble y col., 2000 o por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos:

- Alcanzar una temperatura de 63 - 71 °C en el centro de la carne al cocinarla (Gamble y col., 2000; USDA, 2018; Noeckler y col., 2019).
- Congelar la carne a -20 °C por 12 días, a -10 °C por 20 días (para carnes con espesor de entre 15 a 68 cm) (USDA, 2018). Siendo esto no efectivo para regiones en las cuales se encuentren circulando especies resistentes a la congelación.
- No utilizar el microondas para cocinar la carne, ni tampoco el curado, ahumado o salado de carne como posibles métodos de inactivación de esta parasitosis (Gamble y col., 2000).
- Evitar el consumo de carne cruda de cualquier especie animal.

4. Hipótesis:

- 1) Los jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* no presentan signología clínica y/o alteraciones de la bioquímica sanguínea durante la fase aguda y crónica de la enfermedad.
- 2) Los anticuerpos anti-*T. patagoniensis* y anti- *T. pseudospiralis* permiten predecir y evaluar el comportamiento de la enfermedad en jabalíes.
- 3) Las larvas de *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* tienen capacidad infectante y se distribuyen en la musculatura de los jabalíes, con un patrón similar a *T. spiralis*.
- 4) Las larvas de *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* alojadas en carne de jabalíes, resisten el congelamiento por varias semanas.
- 5) Es posible detectar ADN de LRN circulando en el suero de jabalíes y cerdos infectados con *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y *T. spiralis* por métodos moleculares.

5. Objetivos

5.1. General: Estudiar la infección aguda y crónica de la enfermedad, la susceptibilidad de especie y la respuesta inmune de jabalíes infectados experimentalmente con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*.

5.2. Específicos:

- 1) Estudiar la fase aguda y crónica de la infección experimental con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* en jabalíes.
- 2) Evaluar la dinámica de anticuerpos anti-*T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* en jabalíes.
- 3) Determinar la infectividad y el patrón de distribución de larvas en los grupos musculares de interés parasitológico y comercial.
- 4) Evaluar la tolerancia al congelamiento de las larvas de *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* alojadas en carne de jabalíes.
- 5) Evaluar la capacidad de detección de larvas recién nacidas durante el período de ventana en sueros de jabalíes y cerdos infectados con 20000 larvas L1 de *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* o *T. patagoniensis* por medio de la técnica de

PCR en tiempo real utilizando el cebador Rep y el 18S y el fluorocromo SYBR Green I.

6. Materiales y métodos

6.1. Agentes etiológicos

Se emplearon tres cepas de *Trichinella* para infectar a los jabalíes y cerdos, *T. patagoniensis* código ISS2311, proveniente de un puma de montaña y una cepa de *T. pseudospiralis*, aislada de un cerdo doméstico de la Patagonia (Krivokapich, 2015), y *T. spiralis*, código ISS3558. Todas mantenidas en ratones CF1 en la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, FCV-UBA.

6.2. Tipificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa

Las larvas de *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y *T. spiralis*, fueron identificadas a nivel de especie a través de la técnica de Nested PCR del segmento de Expansión 5 y las regiones espaciadoras ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal, y mediante el método de PCR RFLP del gen mitocondrial de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa, de acuerdo a los procedimientos publicados por Zarlenga y col., 1999 y Nagano y col., 1999, respectivamente. Para la preparación del ADN, se colocó una larva en 5 µl de buffer de lisis (10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCL, 2.5 mM MgCl₂, 0.45% tween-20, 0.45% NP-40, 0.01% gelatina) que contiene proteinasa K (5µg), cubierto con una gota de aceite mineral, se calentó a 65 °C durante 90 minutos, luego a 90 °C durante 15 minutos, y se congeló a -20 °C. En el primer y segundo ciclo de Nested PCR se usaron los primers Ne (5'-TCTTGGTGGTAGTAGC + 5'-GCGATTGAGTTGAACGC) e I (5'-GTTCCATGTGAACAGCAGT + 5'-CGAAAACATACGACAACTGC) respectivamente. Se emplearon como controles, larvas de aislamientos de *Trichinella* de referencia: *T. spiralis* (ISS599), *T. nativa* (ISS532), *T. britovi* (ISS447), *T. pseudospiralis* (ISS13), *T. murrelli* (ISS103), *Trichinella* T6 (ISS34) (Nagano y col., 1999; Zarlenga y col., 1999).

6.3. Preparación del inóculo

Se utilizaron 10 ratones adultos machos BALB/c para cada especie de *Trichinella* bajo estudio. Los mismos fueron procedentes del Bioterio de la FCV-UBA.

Cada uno fue inoculado con 500 LM tipificadas en un volumen de 30 µl. Se procedió a realizar la eutanasia a los 45 días post-infección (d.p.i.) por medio de la dislocación cervical manual. Previamente a la realización de este procedimiento se sedó a cada ratón con 60 mg/kg de ketamina y 6 mg/kg de xylacina vía intra-peritoneal. Para dislocación cervical se sujetó con el pulgar y el dedo índice a cada lado del cuello, y con la otra mano se jaló rápidamente de la base de la cola produciendo la separación de las vértebras cervicales del cráneo (Avma Guidelines for the Euthanasia of animals 2013). Las larvas musculares fueron recuperadas por medio de la técnica de digestión artificial descrita por Gamble y col. (2000) y posteriormente utilizadas para elaborar los inóculos para los jabalíes y cerdos.

6.4. Manejo de los animales

Para este estudio se utilizaron 17 jabalíes (*Sus scrofa*) y 6 cerdos (*Sus scrofa*).

Los jabalíes y los cerdos provinieron de dos establecimientos distintos, de la provincia de Buenos Aires. Estos se encontraban destetados con 28 días de edad. Cada animal fue identificado por medio de una caravana Allflex®, utilizando la pinza Total Tagger de Allflex®.

Todos fueron vacunados para prevenir neumonías y pleuroneumonías bacterianas.

Para descartar la presencia de parásitos intestinales se realizaron estudios coproparasitológicos. Para esto se recolectó materia fecal con guantes descartables y se conservó en frío hasta su procesamiento. Dichas muestras fueron analizadas por el método de flotación con solución sobresaturada de CINa, sedimentación de Telemann, Dennis-Stone-Swanson (Rosa y Ribicich, 2012). El procedimiento se repitió una vez por semana durante toda la experiencia.

Los grupos de trabajo se confeccionaron con una tabla de números al azar. Cada grupo fue colocado en un box, con un tamaño adecuado para que los animales puedan desarrollar sus conductas y necesidades fisiológicas. Las instalaciones en donde se alojaron los animales pertenecen a la FCV-UBA, restringiéndose el ingreso solo al personal autorizado.

Los animales fueron alimentados con alimento de crecimiento administrado según sus necesidades. El mismo estaba formulado con:

- maíz 63.5%
- pellet de soja 34%
- Pig feed crecimiento 2.5% (Cladan S.A.)



Figura 1. Alimentación de los animales utilizando maxi tolvas.

Las instalaciones y el protocolo de trabajo cuentan con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (CICUAL) N.º 2015/16 y 2018/22.



Figura 2. Alimentación de los animales utilizando maxi tolvas. Piso de rejillas de plástico para cerdos.

6.5. Revisión clínica

Se realizó cada 48 h el examen objetivo general (EOG) de todos los animales. Se inició observando su comportamiento, condición corporal y actitud. Posteriormente se procedió a realizar la revisión por inspección general y particular a cada animal evaluando el estado de su piel y anexos, tipo respiratorio, mucosas y pabellones auriculares.

Semanalmente los jabalíes fueron pesados durante la fase aguda de la enfermedad (hasta los 45 días p.i.).



Figura 3. Animales a punto de ser revisados.

6.6. Inoculación de los animales

6.6.1. Jabalíes

Los animales fueron separados en 4 grupos. Dos grupos de 5 animales (uno para *T. patagoniensis* y otro para *T. pseudospiralis*), un grupo de 4 animales (inoculados con *T. spiralis*) y un grupo de 3 animales (grupo control no infectado). Luego de un período de adaptación al nuevo ambiente de 30 días los animales fueron inoculados por vía oral con 20000 LM en un volumen total de 2 ml. Se utilizó una sonda que desembocaba en el fondo de la cavidad oral, adaptada a una jeringa (Fig. 4). Para cada animal se emplearon materiales descartables. Una vez realizada la inoculación, se procedió con

tres lavajes con solución fisiológica de todos los materiales para facilitar el arrastre de larvas que pudiesen haber quedado en las paredes de estos elementos, de esta forma se evitó la pérdida de larvas en el inóculo.

Los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* fueron utilizados para cumplir con todos los objetivos del estudio, mientras que los jabalíes infectados con *T. spiralis* para cumplir el objetivo N° 5.



Figura 4. Jabalí siendo inoculado por vía oral.

6.6.2. Cerdos

De los 6 cerdos, dos fueron inoculados con 20000 L1 de *T. spiralis*, dos con 20000 L1 de *T. pseudospiralis*, y uno fue inoculado con 20000 L1 de *T. patagoniensis*, se utilizó un animal como control. Cada uno se inoculó por vía oral, en un volumen total de 3 ml. Para cada animal se utilizaron materiales descartables. Una vez realizada la inoculación, se efectuaron tres lavajes con solución fisiológica de los materiales para facilitar el arrastre de larvas que pudiesen haber quedado en las paredes de estos elementos, de esta forma se evitó la pérdida de larvas en el inóculo.

Los cerdos fueron utilizados para cumplir con los objetivos N° 5.

6.7. Extracción periódica de sangre

6.7.1. Jabalíes

Sobre todos los animales se realizaron extracciones de sangre por punción de la vena yugular (Fig. 5). Las mismas se realizaron la semana 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15, y 19 p.i. Las muestras de sangre fueron colocadas en un tubo con EDTA y en otro sin anticoagulante con el fin de obtener el suero para ser utilizado en estudios posteriores, y sangre entera para la realización de frotis sanguíneos

Para la obtención del suero, las muestras sin anticoagulante fueron sometidas a una centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos. Posteriormente el suero fue colectado con micropipeta, fraccionados (100 µl) en microtubos de 1,5 ml rotulados y almacenados a – 80 ° C hasta su uso.



Figura 5. Extracción de sangre por punción de la vena yugular.

6.7.2. Cerdos

Se extrajo sangre de todos los cerdos por punción de la vena yugular. Esto se realizó los días 2, 5, 9, 12 y 15 p.i. de los animales inoculados con *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* y el control negativo, y los días 2, 6, 10, 12 y 15 p.i. del cerdo infectado con *T. patagoniensis*. Las muestras se recolectaron en tubos sin anticoagulante. Estas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Luego el suero fue recolectado con una

micropipeta y fue fraccionado (100 µl) en eppendorfs, rotulados y congelados a -80 °C hasta ser utilizados.

6.8 Técnica de May-Grünwald Giemsa

Los frotis se efectuaron para realizar el conteo relativo diferencial de leucocitos con el fin de poder determinar el recuento relativo de eosinófilos. Los mismos previos a su lectura se tiñeron con May- Grünwald Giemsa. Esta técnica consiste en (Rosa y Ribicich, 2012; Deepthi y col., 2022):

1. Elaboración de los frotis.
2. Secar al aire (3 minutos).
3. Fijar con metanol (3 minutos).
4. Colorear con la tinción de Giemsa diluida en 1:10 con agua destilada (30 minutos).
5. Lavar con agua.
6. Secado al aire.
7. Visualización de los preparados en el microscopio óptico.

6.9. Técnicas coproparasitológicas (Rosa y Ribicich, 2012)

1. Técnica de flotación con solución sobresaturada de CINA

Para realizar esta técnica se toma una muestra de materia fecal (5 – 10 g) y se homogeniza con 60 ml de solución de Cloruro de Sodio (CINa) utilizando un mortero. Esto luego se filtra a través de un colador hacia un vaso de precipitados y se deja reposar por 20 minutos. Luego con un ansa se toma una muestra de la superficie y la misma se coloca entre un porta y cubre objetos para ser visualizada en un microscopio óptico.

Solución de CINa: en un litro de agua caliente se disuelven 400 g de sal agitándose constantemente. Esta debe tener una densidad de 1200, ya que es una solución sobresaturada de CINa.

2. Técnica de Sedimentación de Telemann modificado

Se homogeniza la materia fecal con agua destilada. Se filtra a través de una gasa triple hacia un tubo de centrífuga hasta 3 ml. Se adiciona hasta 7 ml del reactivo de Telemann, el cual consta de 5 g de ClNa, 950 ml de agua destilada y 50 ml de formol. Por último, se adicionan 2 ml de éter etílico. Esto se agita y se centrifuga a 1500 rpm por 10 minutos. Luego se vierte el sobrenadante y se toma una muestra del sedimento que se observa entre un porta y cubre objetos en un microscopio óptico.

3. Técnica de Denis-Stone-Swanson

Para esto, se debe morterear la muestra de materia fecal (5 g) con la solución detergente. Luego esto se filtra a través de un colador hacia un vaso cónico, completando hasta llegar a los 100 ml. Se esperan 5 minutos y luego se sifonea desde la superficie hasta los 2/3 del vaso. Luego se vuelve a colocar solución detergente en el vaso cónico, hasta los 100 ml. Esto se deja reposar por 3 minutos y luego nuevamente se sifonea dejando el sedimento. Por último, se realiza un tercer lavado dejando sedimentar luego por 2 minutos y se sifonea quedando un sedimento de 15 ml. Al sedimento se le adiciona unas gotas de tintura de lodo y luego este se vierte hacia una placa de Petri para ser visualizado utilizando una lupa estereoscópica y otra muestra a un porta objetos para observar en un microscopio óptico.

Solución detergente: 995 ml de agua, 5 ml de detergente, 8 gotas de alumbre de Fe al 1%.

6.10. Eutanasia y necropsia de los animales

Los jabalíes fueron eutanasiados a las 19 semanas p.i. La misma se realizó con agentes farmacológicos no inhalatorios. Las drogas utilizadas fueron maleato de acepromacina 0,03-0,1 mg/kg + ketamina 2-6 mg/kg IM, luego se administró tiopental sódico 80 mg/kg endovenoso (EV) en vena auricular (con butterfly N.º 21 o 19) según Protocolo CICUAL 2015/16.

Una vez realizada la eutanasia se procedió a realizar la necropsia de forma individual de cada animal según Quse y Falzoni, 2008. Para esto se colocó al jabalí sobre una mesada en decúbito dorsal y se incidió por la línea media desde el mentón hasta el ano. De esta forma se separó la piel y subcutáneo de las masas musculares. Para separar los miembros, se apartaron a partir de los músculos ubicados debajo de las escápulas (miembros anteriores) y a partir de la articulación coxofemoral cortando el ligamento

redondo (miembros posteriores). Luego se continuó abriendo el tórax por medio de una incisión realizada desde la región xifoidea, pasando por la unión de las costillas al esternón (unión condro-esternal) hasta la primera costilla. A su vez, se bordeó y cortó toda la pared costal de la última costilla (abordaje para-costal). Luego se extrajeron los pulmones, corazón, tráquea, laringe y esófago. Una vez realizado esto se realizó la apertura del abdomen iniciando desde la última costilla hacia la sínfisis isquio-pubiana, tuberosidad coxal. Previo a la extracción de los intestinos se hizo una doble ligadura en la zona del recto, en el cardias y en el duodeno para así poder cortar entre las mismas y evitar que el contenido intestinal se vierta en la cavidad abdominal. Luego se retiró el bazo, hígado (ligando previamente los grandes vasos), para terminar, retirando los riñones y vejiga (Quse y Falzoni., 2008).

Mientras se realizó la necropsia se tomaron fotos para registrar las tareas realizadas. Se recolectaron y separaron los músculos de interés para su posterior evaluación.

Durante la necropsia se tomaron todas las muestras musculares necesarias para llevar a cabo todas las experiencias del estudio.



Figura 6. Necropsia de los jabalíes.

6.11. Digestión artificial de las muestras para el estudio del patrón de distribución de larvas en los jabalíes

Las muestras de músculo de interés parasitológico y comercial se extrajeron durante la necropsia de cada animal. Las mismas fueron empaquetadas en bolsas herméticas y rotuladas con el número del animal, fecha y el nombre de la masa muscular. Se mantuvieron refrigeradas a 4 ° C hasta su procesamiento.

Los mismos fueron: lengua, diafragma, maseteros, intercostales, porción muscular del esófago, paletas, jamones, bondiola y solomillo (Pasqualetti, 2014, Ribicich y col, 2001). Se procesaron 20 g de músculo de cada muestra.

Inicialmente para *T. patagoniensis* se utilizó la misma cantidad, pero al encontrar baja carga parasitaria y al no tener evidencia previa de infecciones de dicha especie en jabalíes, se decidió aumentar la sensibilidad aumentando la cantidad de músculo muestreado (100 g).

Cada una fue procesada individualmente por 5 segundos en una multiprocesadora, previamente habiéndose removido la grasa y fascias, luego fueron colocadas junto con el líquido de digestión (1% de pepsina 1:10000, 1.0% de ácido clorhídrico y agua) en un vaso de precipitados. Una vez que se completó la digestión en el agitador magnético a 45 ± 2 ° C, se procedió a filtrar las muestras a través de un tamiz de 80 meshes hacia una ampolla de Squibb. Se dejó sedimentar por 30 minutos, se recuperaron 40 ml del sedimento y luego se procedió a otra sedimentación con el fin de obtener las larvas en un volumen total de 10 ml. Posteriormente se realizó el conteo de larvas utilizando un microscopio óptico invertido. Se determinó la cantidad de larvas encontradas por gramo de músculo digerido (Gajadhar y col., 2019).



Figura 7. Fotografía de los instrumentos utilizados para realizar la digestión artificial.



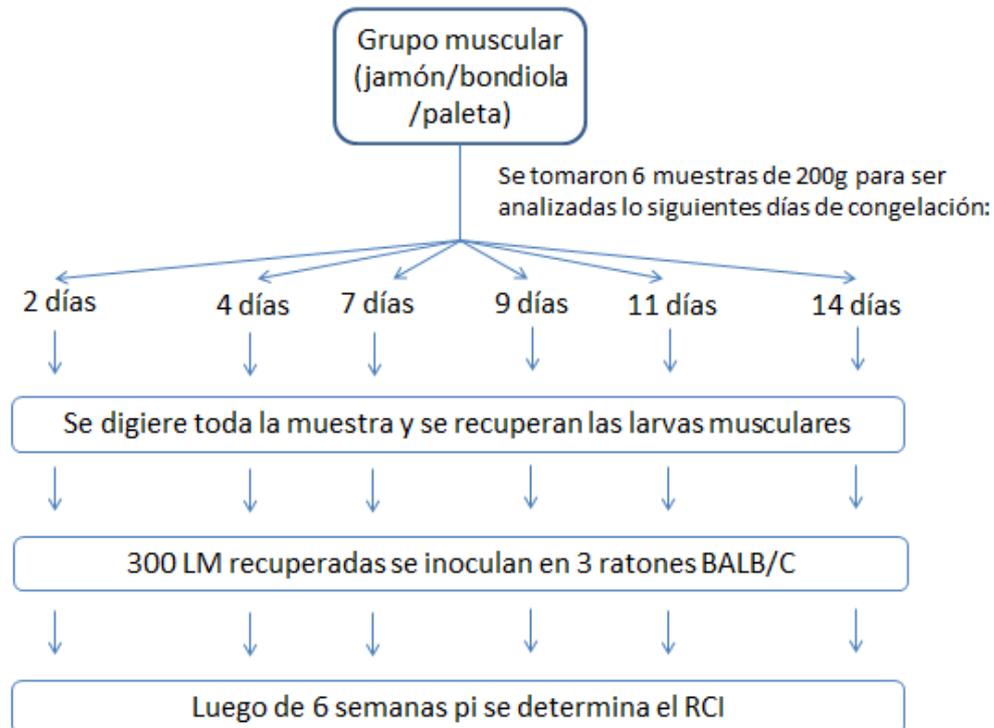
Figura 8. Pasos de la digestión artificial (digestión, filtrado y visualización en el microscopio).

6.12. Evaluación de la tolerancia al congelamiento de las larvas L1 de *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*

Para evaluar la tolerancia al congelamiento de las larvas L1 se tomaron muestras de bondiola, jamón y paleta. Previamente, cada grupo muscular se procesó para confirmar la positividad y determinar la carga parasitaria de cada uno, por medio de la técnica de digestión artificial.

Posteriormente, los 3 grupos musculares fueron divididos en 12 muestras de dimensiones similares (2 cm de espesor y 200 g de peso), envasadas individualmente en bolsas plásticas y rotuladas. Un juego de 6 muestras fue colocado en un freezer a -20 °C y otro fue mantenido como grupo control (4°C). En cada fecha de muestreo 2, 4,

7, 9, 11 y 14 días sometidos al ambiente propuesto, se extrajo una muestra congelada y otra refrigerada para ser procesadas por medio de la técnica de digestión artificial. Las larvas recuperadas fueron posteriormente inoculadas en 3 ratones BALB/c (300 larvas en un volumen de 20 µl). Esto se realizó para cada grupo muscular (bondiola, paleta y jamón).



Luego de 6 semanas p.i., los ratones fueron eutanasiados, sus carcasas fueron individualmente digeridas por medio de la técnica de digestión artificial y se calculó el Índice de Capacidad Reproductiva (RCI) (Kapel y Gamble, 2000).

$$x = \frac{\text{Larvas recuperadas}}{\text{Larvas inoculadas}}$$

En la fecha de muestreo en la cual se observó la pérdida de la viabilidad de las larvas se decidió dejar de inocular ratones para calcular el RCI. Para determinar la viabilidad de estas larvas, estas se observaron a través de un microscopio óptico. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para establecer la muerte de las larvas fueron la falta de motilidad, la total alteración morfológica de la larva, la pérdida de su forma enroscada como también de su contenido. Para evaluar la motilidad de las larvas sometidas a la congelación, luego de descongelar las piezas de carne y recuperar las larvas allí presentes, estas se colocaron a 37 °C por 2 h para aumentar su motilidad, y así se observaron bajo un microscopio invertido LEICA™ DMi1 (Leica, Wetzlar, Alemania).

Luego de realizar los conteos se calcularon los porcentajes de larvas muertas recuperadas en cada una de las muestras.

El porcentaje de larvas muertas promedio fue calculado a partir del volumen final de la muestra obtenida tras su digestión (5 ml). Se tomaron 10 muestras de 20 µl, y se realizó el conteo de larvas recuperadas en las mismas para calcular el promedio de larvas muertas en función a la cantidad de larvas recuperadas.

Ya que no se pudieron obtener resultados con *T. patagoniensis* en los jabalíes, se decidió incorporar un nuevo experimento de tolerancia a la congelación de L1 presentes en músculos de ratones inoculados experimentalmente con esta especie de *Trichinella*. Para esto, se utilizaron 7 ratones inoculados con 500 L1 de *T. patagoniensis*. Cada ratón fue empleado para un punto de muestreo. Los mismos fueron: 2, 4, 7, 9, 11 y 14 días. Estos se eutanasiaron luego de 50 días p.i. Mitad de cada ratón fue colocado en un freezer a -20 °C y su otra mitad bajo refrigeración a 4 °C para ser utilizado como controles. En cada fecha de análisis se digirió mitad de ratón congelado y su otra mitad refrigerada de forma individual por medio de una digestión artificial. Luego se procedió a realizar el conteo de larvas recuperadas y las mismas fueron inoculadas en 3 ratones. Al cabo de 45 días, estos ratones fueron eutanasiados, sus carcasas se digirieron artificialmente y se llevó a cabo el conteo de larvas y cálculo de RCI.

6.13. Estudio de la dinámica de anticuerpos anti-*Trichinella*

1. Procedimiento de análisis

El título de anticuerpos de cada jabalí fue analizado a través de la técnica de ELISA, utilizando los sueros. Se utilizó un kit comercial, "PrioCHECK *Trichinella* Ab", siguiendo sus instrucciones.

Para comenzar se reconstituyeron los controles con 150 µl de agua desmineralizada proveniente con el kit. Esto se mezcló con un vórtex. Una vez reconstituidos los controles (fuerte positivo, débil positivo y negativo), se procedió a diluir la muestra de suero. Para esto se utilizó una placa de dilución sin recubrir, a la que se le añadió 10 µl del control positivo fuerte en el pocillo A1 y B1, 10 µl de control positivo débil en el pocillo C1 y D1, y 10 µl de control negativo en los pocillos E1 y F1. En el resto de los pocillos se colocó 10 µl de cada una de las muestras de suero, por duplicado. Luego se agregó 90 µl del diluyente a cada pocillo con una pipeta multicanal y se mezcló 5 veces. Se añadieron a la placa de dilución 80 µl de diluyente de muestra en cada pocillo, para así luego transferir 20 µl de las muestras ya diluidas de la placa de dilución hacia la placa de ensayo, se mezcló cada una 5 veces. Posteriormente se incubó por 30 ±1 minutos a

temperatura ambiente de 22 ± 3 °C, y se procedió a lavar la placa cuatro veces con 300 µl de la solución de trabajo de líquido de lavado 1x. Luego se incubó el conjugado, que previamente había sido diluido 30 veces en diluyente de conjugado. Para esto se agregó 100 µl del conjugado diluido a cada pocillo de la placa de ensayo y se dejó incubar 30 ± 1 minutos a 22 ± 3 °C. Se lavó la placa cuatro veces con 300 µl de solución de trabajo de líquido de lavado 1x. Una vez finalizado el lavado se comenzó con los pasos de detección. Se colocó 100 µl del sustrato cromógeno (TMB) en cada pocillo y se incubó a 22 ± 3 °C durante 15 minutos, y luego se agregó 100 µl del conjugado diluido a cada pocillo. Se comenzó a agregar la solución de frenado luego de 15 minutos de haber comenzado a colocar en el primer pocillo el TMB, en toda la placa siguiendo el mismo orden de colocado el TMB. Una vez terminado, se agitó suavemente la placa por unos segundos y se colocó en el lector de ELISA. El desarrollo de color se mide a una longitud de onda de 450.

El punto de corte se determinó en función a lo especificado en el kit:

$$\frac{OD_{450\text{ nm Muestra}}}{OD_{450\text{ nm Control positivo}}} * 100 = X\% \text{ positividad}$$

Se toma como punto de corte un valor de Porcentaje de Positividad (PP) del 15 %. Se consideran positivos a los resultados iguales o superiores a 15 de PP, y los inferiores a dicho valor se consideran negativos. El punto de corte que se obtuvo fue de 0.31.

2. Análisis estadístico

Para comparar los tratamientos en el tiempo se aplicó un diseño de medidas repetidas en el tiempo con interacción tiempo*tratamiento. Como la prueba de esfericidad de Mauchly resultó significativa ($p\text{-valor} < 0.05$) se ajustaron los grados de libertad para el error experimental mediante la épsilon de Greenhouse-Heisser. Para corregir la normalidad se aplicó la transformación logaritmo natural a la variable respuesta (OD).

Como la interacción tiempo*tratamiento resultó significativa, se compararon los tratamientos en cada tiempo.

6.14. Detección temprana de larvas recién nacidas por medio de PCR en tiempo real

Siguiendo estos hilos de investigación se decide implementar una técnica de diagnóstico molecular denominada PCR en tiempo real para analizar sueros provenientes de jabalíes y cerdos infectados con una especie de *Trichinella* spp., *T. spiralis*, *T. patagoniensis* o *T. pseudospiralis*. Con la misma se buscó identificar estadios previos a las larvas musculares que se detectan por medio de la digestión artificial, específicamente detectar las LRN. También se analizaron los animales control.

Para esto se utilizaron 2 cebadores para identificar las 3 especies de *Trichinella* spp. bajo estudio. Un cebador que amplifica una región de ADN nuclear repetida (Rep) en *T. spiralis*, y el segundo cebador que amplifica un segmento de la región ribosomal nuclear el 18S de *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis*.

Previo a la puesta en práctica, se evaluaron varios factores que podrían llegar a alterar los resultados. Estos fueron:

- Evaluación de los cebadores.
- Concentración de ADN utilizada.
- Cantidad de ciclos a realizar en la PCR.
- Evaluar formas de pipeteo en la extracción de ADN, con el fin de estandarizar todas las maniobras para reducir variabilidades y así errores.
- Pruebas control para verificar que no haya contaminación en las corridas de PCR en tiempo real.

1. Extracción del ADN

Se utilizaron muestras de sueros provenientes de jabalíes y cerdos infectados con 20000 larvas de *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* o *T. patagoniensis*.

Para extraer el ADN de las LRN que posiblemente pudieran encontrarse en el suero se utilizó un kit comercial denominado DNeasy® Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, USA), y se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante, y se eluyó en 100ul.

Con este kit, inicialmente las muestras de sangre se lisan mediante la proteinasa K y luego el ADN se une selectivamente a la membrana DNeasy durante la centrifugación, mientras que los contaminantes son eliminados. Los posibles contaminantes residuales como también los inhibidores enzimáticos se descartan por medio de 2 lavados adicionales, y finalmente el ADN es eluído con agua ultrapura.

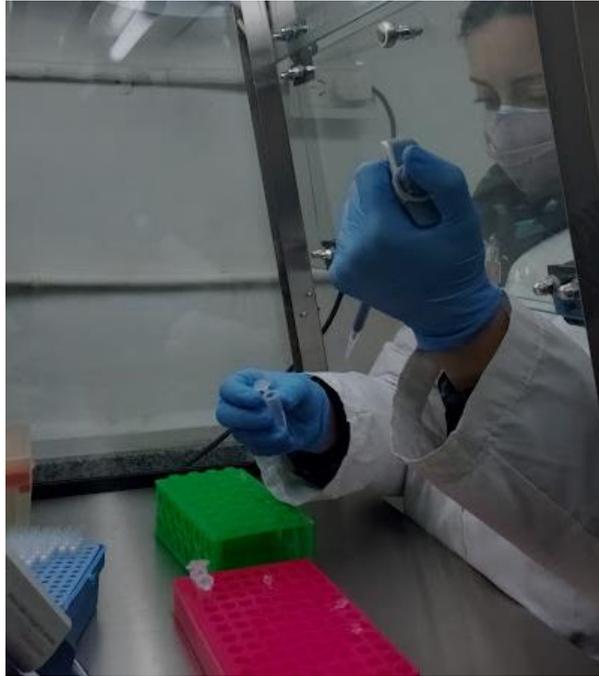


Figura 9. Extracción de ADN.

2. Cebadores

Como cebadores se utilizaron:

- **Rep**, diseñado en función del elemento repetitivo 1.6 kb de *T. spiralis* (código de acceso del GenBank: X06625). Cuya secuencia nucleotídica es:

5' TTCTATTCTGCTACTGCTAACACTTCGA '3

5' TGGTGTGGCTCAAGAATGGA '3

Tm: 75 °C.

- **18S**, diseñado en función a la subunidad 18S del gen de ARNr nuclear (código de acceso del GenBank: U60231). Cuya secuencia nucleotídica es:

18S-T1-T12-F CGGTTAAAACGCTCGTAGTTGA

18S-T1-T12-R GCAACAACAGCAACCACGAA

Tm: 82 °C.

Los cebadores se utilizaron a una concentración de 6,25 µM.

Los cebadores se diseñaron por el Dr. Silvio Krivokapich, utilizando el programa Primer Express v2.0 (Applied Biosystem). Para esto se tomaron como parámetro los siguientes factores (Krivokapich, 2012):

- T_m entre un 58°C a 60°C +/- 2°C;
- Longitud de amplicones entre 110-150 pb;
- Longitud de los cebadores de 9 a 40 pb, óptimo 20 bp;
- Contenido de G/C dentro de un 30 a 80%.

3. PCR en tiempo real

Para realizar este análisis molecular se utilizó el equipo al ABI 7500 Sequence Detector System (Applied biosystems) con el programa 7500 System SDS software versión 1.2.3.

Para esto se realizaron los siguientes ciclos:

- 2 minutos a 50 °C,
- 10 minutos a 95 °C,
- 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C,
- 60 segundos a la temperatura de fusión (60 °C).

El equipo al finalizar los ciclos realizó el análisis de disociación, ya que se dispuso dicho parámetro/paso antes de iniciar la PCRrt. La misma constó en:

- 15 segundos a 95 °C,
- 1 minuto a 60 °C,
- 15 segundos a 95 °C.

Como fluoróforo se utilizó el SYBER® Green, cuya fluorescencia se midió en cada ciclo a la temperatura de annealing. Para esto se utilizó como mezcla de reacción a SYBR® Select Master Mix* (Applied Biosystems, USA), a un volumen de 12,5µl. El volumen final de la reacción constó de 25 µl, de los cuales:

- 12,5 µl correspondían a la mezcla de reacción master mix,
- 1 o 5 µl de ADN de la muestra (se probó con ambas cantidades),
- 2 o 4 µl de cebadores (se probó con ambos volúmenes),
- el resto de agua ultrapura c.s.p. (9,5, 7,5 o 3,5 µl según la cantidad de cebadores como de AND utilizados).

La amplificación de ADN de cada suero se realizó por duplicado.

*La mezcla de reacción SYBR® Select Master Mix de Applied Biosystem, USA contiene:

- SYBR™ GreenER™, como colorante,
- ADN polimerasa AmpliTaq™,
- dNTPs con mezcla dUTP/Dttp,
- UDG termolábil,
- ROX, como colorante de referencia pasiva,
- Componentes de tampón.

Los resultados obtenidos tras realizar una PCR en tiempo real se expresan como el número de ciclos de PCR que son necesarios para alcanzar un cierto nivel de fluorescencia (ciclo umbral, Ct). La señal de fluorescencia emitida durante los primeros ciclos es débil para poder ser detectada por sobre el ruido de fondo, pero durante la fase exponencial la señal comienza a duplicarse en cada ciclo. Luego de 30 a 35 ciclos aproximadamente, esta señal comienza a estabilizarse ya que comienza a saturarse los reactivos de la PCR. El valor de Ct se correlaciona con la cantidad inicial de la muestra objetivo y la diferencia en el número de ciclos necesarios para lograr el mismo nivel de fluorescencia, reflejándose así la concentración relativa de un objetivo con el otro.

7. Resultados

7.1. Inspección clínica

Durante la evaluación física de los animales no presentaron afección, alteración o signos clínicos compatibles con esta enfermedad.

Los estudios coparazitológicos que se realizaron durante la experiencia fueron negativos.

7.2. Ganancia de peso

En el gráfico N° 1, se puede observar el promedio de los pesos de los jabalíes infectados a lo largo de los 45 d.p.i..

Al comparar la ganancia de peso entre los animales inoculados y el grupo control no se evidenció diferencia significativa. Se aplicó un diseño de medidas repetidas en el tiempo (3 observaciones a los 15, 30 y 45 días) un tratamiento (*T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*) y un grupo control. Se utilizó un modelo lineal mixto y se consideró un nivel de significación del 5%. No se encontraron diferencias estadísticamente

significativas entre tratamientos (p -valor <0.67) ni tampoco se encontraron diferencias en el tiempo (p -valor <0.056). No hubo interacción entre los factores en estudio. Esto fue analizado utilizando R (R Core team, 2018).

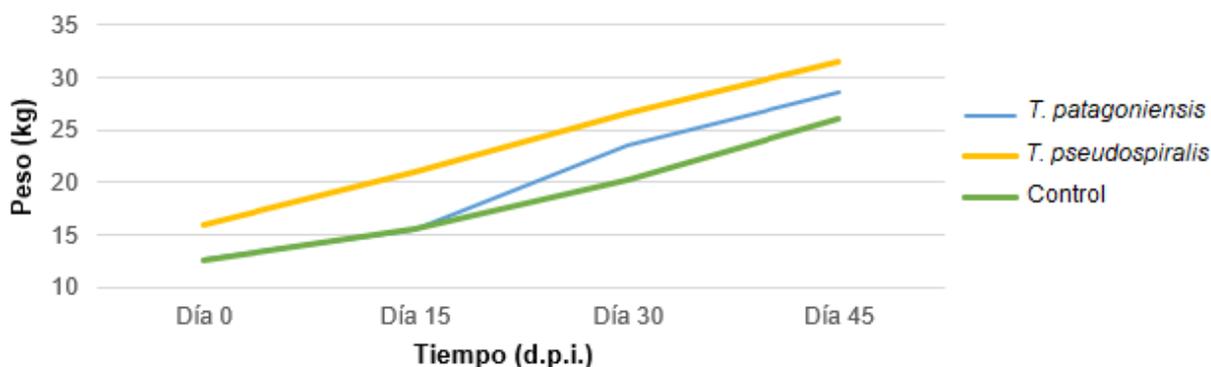


Gráfico N° 1. Peso promedio expresado en kg de los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis*, y los controles. Evaluados los primeros 45 d.p.i.

7.3. Recuento relativo de eosinófilos

Los jabalíes infectados mostraron cambios en los niveles de eosinófilos en sangre. Los animales inoculados con *T. pseudospiralis* mostraron un aumento en el recuento relativo de eosinófilos inmediato a la inoculación, mientras que en los animales infectados con *T. patagoniensis* el aumento se vio una semana más tarde (Gráfico 2). El primer aumento se observó principalmente entre la semana 2 a 3 pi, con conteos que llegaron hasta 20 %. Posteriormente disminuyeron alcanzando valores dentro del rango normal.

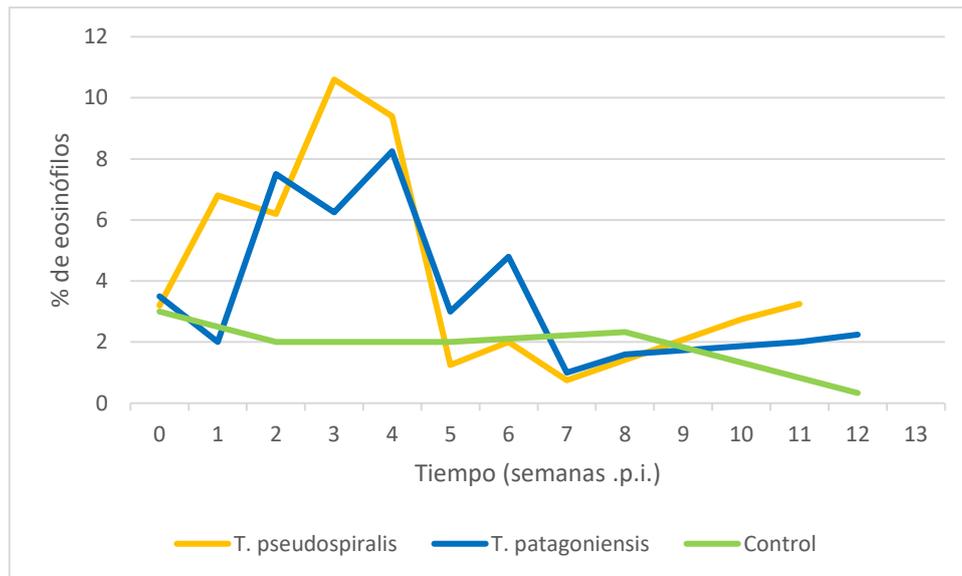


Gráfico 2. Porcentaje promedio del recuento relativo de eosinófilos en jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* durante 94 d.p.i.

7.4. Distribución larvaria

Ambas especies de *Trichinella* mostraron predilección principalmente por la lengua y el diafragma. Seguidamente, los músculos más predilectos fueron para *T. patagoniensis* las paletas, mientras que para *T. pseudospiralis* los solomillos y bondiolas (Tabla 1). Las cargas larvarias más altas fueron: para *T. pseudospiralis* 134,3 lpg (en lengua y músculos intercostales) y para *T. patagoniensis* de 0,087 lpg (en la lengua) (Tabla 2). *T. patagoniensis* presentó una densidad larvaria considerablemente inferior a *T. pseudospiralis*. Además, en los jabalíes inoculados con esta especie no se recuperaron larvas musculares de los maseteros ni de los músculos intercostales (Tabla 1 y 2). De dos de los 5 jabalíes infectados con *T. patagoniensis* no se lograron detectar LM, en ningún músculo analizado (Tabla 1).

Diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas en la recuperación de larvas entre las especies bajo estudio. Esto fue analizado utilizando R (R Core team, 2018). La recuperación de LM se analizó mediante el análisis de varianza de Kruskal Wallis ($P < 0,050$).

Los resultados son presentados en la Tabla 1 y en la Tabla 2.

Carga larvaria expresada como porcentaje (%) / N.º de Jabalí	<i>T. patagoniensis</i>					<i>T. pseudospiralis</i>			
	1	2	3	4	5	1	2	3	4
<i>Diafragma</i>	22,9	100	0	0	66,6	23,3	97,7	100	100
<i>Músculo del esófago</i>	75,9	0	0	0	0	1,7	23	8,4	4,7
<i>Intercostales</i>	0	0	0	0	0	1,7	18,8	11,5	10,8
<i>Solomillos</i>	22,9	0	0	0	33,3	10,3	67,4	47,5	27,5
<i>Lengua</i>	100	25	0	0	100	100	100	21,9	49,3
<i>Maseteros</i>	0	0	0	0	0	5,4	45,3	0	9,1
<i>Bondiolas</i>	22,9	0	0	0	0	7,8	59,8	36,6	21,1
<i>Paletas</i>	22,9	25	0	0	33,3	3,3	15,5	14,4	6,6
<i>Jamones</i>	22,9	0	0	0	0	11,1	25,1	13,1	21,1

Tabla 1. Carga larvaria de jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* en músculos de interés parasitológico y comercial. La carga larvaria está expresada en % utilizando como referencia del 100% al músculo con mayor densidad larvaria.

	<i>T. patagoniensis</i>		<i>T. pseudospiralis</i>	
	Promedio	Desvío estándar	Promedio	Desvío estándar
<i>Diafragma</i>	0,016	±0,017	63,2125	±55,087
<i>Esófago</i>	0,0132	±0,030	9,455	±14,374
<i>Intercostales</i>	0		36,7875	±65,168
<i>Solomillo</i>	0,006	±0,009	32,745	±39,239
<i>Lengua</i>	0,0254	±0,037	60,8775	±54,484
<i>Maseteros</i>	0		17,9975	±28,801
<i>Bondiola</i>	0,004	±0,009	27,82	±35,466
<i>Paletas</i>	0,008	±0,008	7,9325	±8,753
<i>Jamones</i>	0,004	±0,009	15,3625	±13,771

Tabla 2. Densidad larvaria promedio y desvío estándar por grupo muscular y especie de *Trichinella* bajo estudio.

7.5. Tolerancia a la congelación

Debido a la baja carga de larvas musculares encontradas en los músculos de los jabalíes infectados con *T. patagoniensis*, no pudo realizarse la evaluación de la tolerancia a la congelación de las larvas musculares en esta especie animal. Las densidades larvarias promedio en jabalíes infectados con *T. patagoniensis* fueron:

- ✓ Bondiola: 0,004 lpg.
- ✓ Paleta: 0,008 lpg.
- ✓ Jamón: 0,004 lpg.

Por este motivo, el presente objetivo se realizó con los músculos de los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*.

Las larvas recuperadas de los músculos sometidos al tratamiento de congelación se mantuvieron viables hasta las 48 h posteriores de ser colocadas en el medio propuesto.

A partir del día 4 el valor del RCI fue igual a 0 en todos los grupos musculares estudiados (Gráfico 4).

Con respecto al grupo control las larvas conservaron su viabilidad durante todo el experimento.

A partir del día 9 de congelación más de un 80% de las larvas observadas mostraron signos de muerte al microscopio óptico (Figura 10). Los días 11 y 14 de congelación el porcentaje se elevó al 100% (Gráfico 3), momento en el que se decidió no continuar con la inoculación de ratones para la evaluación de la viabilidad larvaria.

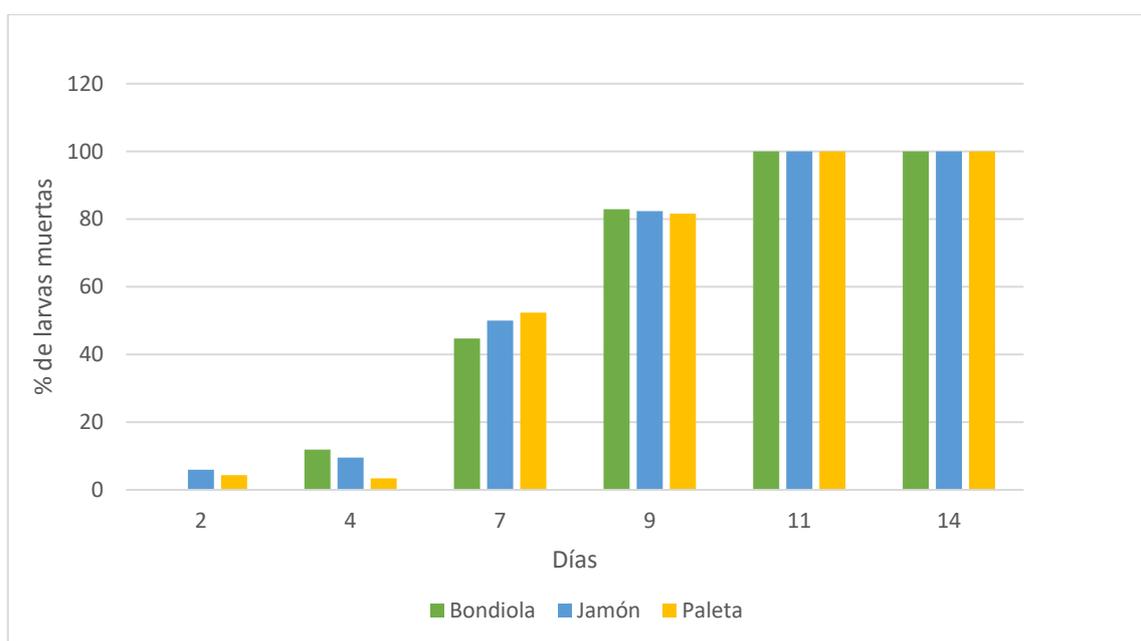


Gráfico 3. Porcentaje de larvas L1 de *T. pseudospiralis* muertas bajo la observación al microscopio óptico, recuperadas de tejidos musculares de jabalíes sometidos a congelación.

Los RCI obtenidos a partir de los ratones inoculados con larvas L1 recuperadas de músculos congelados de jabalíes, y a partir de los ratones inoculados con larvas L1 recuperadas de músculos refrigerados (grupo control) son presentados en la siguiente Tabla 3.

DÍAS DE MUES TREGO	BONDIOLA				PALETA				JAMÓN			
	-20 °C		4 °C		-20 °C		-4 °C		-20 °C		4 °C	
	Promedio	DS										
0	17,04	4,23	17,04	4,23	19,77	6,21	19,77	6,21	22,78	6,45	22,78	6,45
2	18,97	6,19	16,5	6,27	14,87	8,61	19,97	7,35	18,51	8,80	22,71	4,38
4	0	0	17,4	5,99	0	0	21,21	9,70	0	0	18,10	7,64
7	0	0	15,78	5,55	0	0	17,33	6,42	0	0	21,43	8,21
9	0	0	14,58	5,78	0	0	18,77	8,34	0	0	18,81	8,64
11	-	-	14,17	4,11	-	-	16,43	4,80	-	-	19,78	6,20
14	-	-	14,12	4,75	-	-	16,56	6,22	-	-	18,24	4,98

Tabla 3. RCI promedio obtenido tras la inoculación de ratones con larvas musculares sometidas a congelación y refrigeración de carne de jabalí.

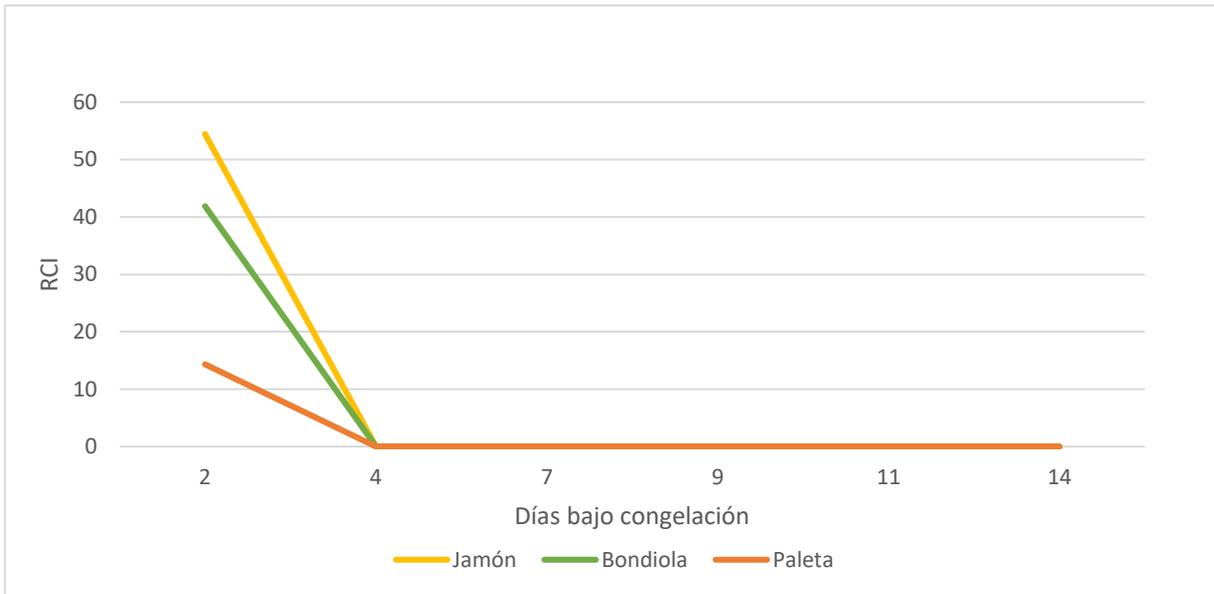


Gráfico 4. RCI obtenido de los ratones inoculados con larvas L1 de *T. pseudospiralis* recuperadas de grupos musculares (jamón, bondiola, paleta) sometidos a -20 °C.



Figura 10. Larvas musculares de *T. pseudospiralis* con características morfológicas alteradas. LEICA™ DMi1 (Leica, Wetzlar, Germany).

Con respecto a la tolerancia a la congelación de las larvas de *T. patagoniensis* en tejido muscular de ratones se obtuvieron los siguientes resultados. A partir de las 48 h (día 2) a -20 °C no se recuperaron larvas en los ratones infectados con larvas provenientes de tejido de ratón mantenida a -20 °C. Las larvas recuperadas de las carcasas de ratones sometidas a temperatura de refrigeración mantuvieron su capacidad infectante durante toda la experiencia (Tabla 4).

DÍAS MUESTREADOS	CONGELACIÓN (-20 °C)		CONTROL REFRIGERACIÓN (4 °C)	
	Promedio	DS	Promedio	DS
0	20,64	3,34	20,64	3,34
2	-	-	15,92	5,78
4	-	-	16,25	5,16
7	-	-	26,51	8,66
9	-	-	10,36	2,37
11	-	-	12,96	8,89
14	-	-	21	7,42

Tabla 4. Promedio de los RCI obtenidos tras la inoculación de ratones con larvas musculares sometidas a congelación y refrigeración de *T. patagoniensis* en carcasas de ratones.

7.6. Dinámica de anticuerpos

Con respecto a la dinámica de anticuerpos, los resultados obtenidos fueron los siguientes; para los jabalíes inoculados con *T. patagoniensis* se observó una seroconversión entre las 2 – 4 semanas p.i., mientras que los inoculados con *T. pseudospiralis* seroconvirtieron a las 2 semanas p.i (gráfico 5). Todos los animales, excepto los controles, se mantuvieron por encima del valor de corte durante toda la experiencia (19 semanas). Diferencias estadísticamente significativas se observaron en los valores de densidad óptica (OD) entre los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* y los inoculados con *T. patagoniensis* a las 2 semanas p.i. ($P < 0.050$).

El valor de corte (cut off) se estableció en función a las especificaciones del kit comercial utilizado. El valor de corte se corresponde con el 15% del porcentaje de positividad (15PP), los resultados superiores o iguales del 15 de PP se consideran positivos, y los resultados inferiores se consideran negativos. En este estudio, dicho valor se correspondió con 0,31.

Los controles negativos se mantuvieron por debajo del valor de corte durante toda la experiencia.

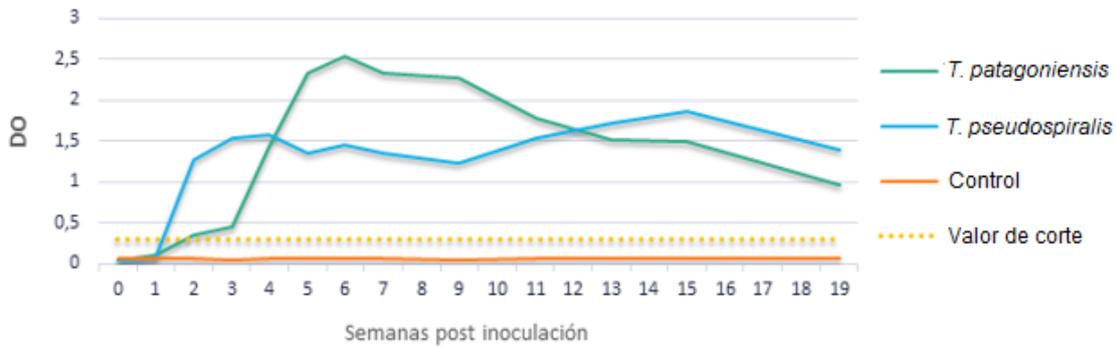


Gráfico 5. Dinámica de anticuerpos en jabalíes inoculados con 20000 larvas L1 de *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y grupo control.

7.7. Detección de larvas recién nacidas por PCR en tiempo real

Los resultados de la detección de LRN en suero de jabalíes y cerdos fueron variables. Las muestras tomadas a los 7 d.p.i. de los jabalíes infectados con *T. spiralis* fueron positivas al ser analizadas con el cebador Rep. Estas muestras positivas presentaron un rango de Ct de $29,26 \pm 0,16$ para una muestra y de hasta $33,37 \pm 0,45$ para otra, y el Ct promedio (de las muestras positivas) fue de $31,91 \pm 1,70$ (Tabla 5). A los 14 d.p.i. no se detectó ADN de LRN en los sueros analizados. Con respecto a los cerdos infectados con *T. spiralis*, el cebador Rep no logró detectar ADN circulante en suero en ninguna fecha muestreada.

El cebador 18S, no logró detectar ADN de LRN en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*, ni *T. patagoniensis* en las fechas muestreadas (7 y 14 d.p.i.). Con este cebador sólo se logró detectar ADN en una muestra a los 7 d.p.i. en un solo jabalí infectado con *T. spiralis* (Tabla 5) cuando se utilizó $1 \mu\text{l}$ de ADN, al aumentar a $5 \mu\text{l}$ de ADN se lograron detectar las otras 3 muestras también como positivas (Tabla 6). La muestra realizada con $1 \mu\text{l}$ de ADN presentó un valor de Ct promedio de $37,32 \pm 0,45$, mientras que las muestras analizadas con $5 \mu\text{l}$ presentaron un rango de Ct de $35,13 \pm 1,02$ a $36,80 \pm 0,29$, con un Ct promedio de $36,21 \pm 1,02$. Al aumentar a $5 \mu\text{l}$ la cantidad de ADN utilizado con las muestras de *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* los resultados igualmente dieron negativos. Este cebador tampoco logró detectar ADN en las muestras de cerdos infectados con las especies bajo estudio en las fechas muestreadas (5, 9, 12 y 15 d.p.i.).

Los controles negativos y positivos utilizados para evaluar las muestras de cerdos y jabalíes dieron negativas y positivas respectivamente, en todas las corridas.

JABALÍ	CEBADOR	CT	DS
1	Rep	29,26	±0,16
2	Rep	33,37	±0,45
3	Rep	32,81	±0,18
4	Rep	32,2	±0,10
1	18s	37,32	±0,45
2	18s	-	-
3	18s	37,58*	-
4	18s	-	-

Tabla 5. Valores obtenidos de Ct y Tm en las muestras de suero de jabalíes infectados con *T. spiralis* 7 d.p.i. analizadas por PCR en tiempo real (CT: valor del ciclo umbral promedio; DS: desvío estándar; TM: temperatura de melting) (* un solo duplicado dio positivo). Cada número de muestra se corresponde con un jabalí infectado con *T. spiralis*.

ANIMAL	CEBADOR	ADN (µl)	CT PROMEDIO	DS
1	18s	1	37,32	0,45
2	18s	5	36,80	0,29
3	18s	5	35,13	1,09
4	18s	5	35,59	1,71

Tabla 6. Valores de Ct promedio obtenidos por detección por PCR en tiempo real, utilizando el cebador 18S, con 1 o 5 µl de ADN de cada muestra de suero 7 d.p.i. Cada animal se corresponde con un jabalí infectado con *T. spiralis* (CT: valor del ciclo umbral promedio; DS: desvío estándar).

8. Discusión

La especie *T. patagoniensis* fue aislada por primera vez en un puma de montaña (*Puma concolor*) en la localidad de Trapalcó, Río Negro, Argentina en 2004 (Krivokapich, 2008). El presente estudio es el primero realizado con jabalíes infectados experimentalmente con *T. patagoniensis*. Se demostró la capacidad de esta especie de desarrollar su ciclo completo en dicho hospedador, sin embargo, se observó una baja capacidad infectiva. Esta misma se encuentra más asociada a *T. nativa* y *T. murrelli* (Krivokapich y col., 2012), dos especies de *Trichinella* que también presentan baja capacidad infectiva en ratas, cerdos (Murrell y col., 2000; Pozio, Zarlenga 2005) y en jabalíes (Kapel, 2001). Krivokapich y col., 2019 demostraron que *T. patagoniensis* también presenta baja capacidad infectiva en ratas y cerdos. Pasqualetti y col., 2014, demostraron que esta especie no completa su ciclo biológico en pollos (*Gallus gallus domesticus*), ya que en estos sólo ocurre la fase intestinal sin desarrollar la fase muscular de la enfermedad. En cuyes (*Cavia porcellus*) infectados experimentalmente con *T. patagoniensis*, Fariña, 2018, demostró que esta especie animal es susceptible a *T. patagoniensis*, ya que la carga larvaria encontrada en dichos músculos fue elevada (265,65 lpg en miembros posteriores). En esta especie animal, los grupos musculares más parasitados fueron los correspondientes a los miembros posteriores, mientras que la lengua fue el músculo con menor carga. Esto toma especial relevancia, ya que, en países como Perú, el consumo, producción y exportación de cuyes es cada vez mayor (Ribicich y col., 2021). Otros estudios demostraron que esta especie también presenta alta capacidad infectiva en gatos domésticos, con algunos signos clínicos similares a los que se producen en las personas (disentería, diarreas, letargia, anorexia parcial como también protrusión del tercer párpado) (Ribicich y col., 2013). Por ende, se podría sospechar que los carnívoros podrían ser hospedadores adecuados para *T. patagoniensis*. Se sugiere que, en nuestro país, el puma (*Puma concolor*) podría actuar como reservorio de esta especie de *Trichinella* (Krivokapich y col., 2012). En El Calafate, provincia de Santa Cruz, en junio de 2008, se detectaron ocho personas infectadas con esta enfermedad tras el consumo de carne de puma (*Puma concolor*) parasitada con *T. patagoniensis* (Krivokapich y col., 2019).

8.1. Aspectos clínicos y productivos

En el presente estudio no se evidenciaron signos clínicos compatibles con esta enfermedad. Esto coincide con lo encontrado por múltiples autores. Tomašovičová y col., 1991, infectaron experimentalmente a ovejas merino con distintas dosis infectivas (3000, 5000 y 7000 L1) y durante los intervalos evaluados (cada 7 días), no se evidenciaron signos clínicos en ninguno de los animales durante todo el estudio. En estudios realizados en equinos tampoco se evidenciaron signos clínicos tras ser

infectados utilizando diversas especies de *Trichinella* (Boireau y col., 2000). Situación similar también se observó en cerdos infectados experimentalmente con *T. spiralis*, (Ribicich y col., 2007; Oltean y col., 2012; Pasqualetti, 2014).

En el presente estudio, el RRE aumentó en promedio durante la primera semana p.i. Similares modificaciones en los conteos relativos de eosinófilos fueron observadas en cerdos infectados con *T. spiralis* (Smith, 1988) en los cuales, el RRE aumentó a los 6 d.p.i. y retornó a valores pre-infección a los 2 meses p.i. Los conteos llegan a valores máximos durante el período de migración e invasión de las fibras musculares por parte de las LRN. Por ende, esto podría ser utilizado fundamentalmente durante la fase aguda, siendo útil durante el período ventana, que ocurre cuando aún no se detectan LM tras la técnica de digestión artificial. A su vez, con respecto al RRE, en todos aquellos jabalíes en los que se encontró alta densidad larvaria, sus valores de RRE fueron también elevados. La eosinofilia es uno de los primeros signos de la trichinellosis humana, es más, el nivel de eosinofilia está directamente relacionado con el nivel de infección (Campbell, 1983). Campbell, 1983, reportó que los eosinófilos suelen llegar a valores de 1000 a 3000/mm³ en infecciones generadas por *Trichinella* spp, aunque en ciertos casos ha sido mayor, incluso aseguró que la proporción de eosinófilos circulantes suele coincidir con aquella encontrada en los músculos. Resultados similares se encontraron en un estudio realizado con cerdos inoculados con *T. spiralis* (Ribicich y col., 2007). En el mismo se evidenció una relación positiva entre la dosis infectiva de *T. spiralis* y el aumento en los niveles de eosinófilos, encontrándose valores de hasta 3500/ml analizado. Por ende, en función a los resultados encontrados podríamos sospechar, que al igual que en la trichinellosis humana, la eosinofilia ocurre simultáneamente con la fase sintomática, aguda de la enfermedad, y se correlacionaría con la intensidad de la infección.

Campbell, 1983, estableció que el aumento de eosinófilos se desencadena por dos mecanismos, ya sea como una respuesta quimiotáctica a agentes liberados a partir de diversos agentes involucrados en la protección inmune (mediadores como por ejemplo células mastocíticas, linfocitos, el complemento), como también debido la capacidad dependiente entre anticuerpos y el complemento con los eosinófilos para dañar a las L1. Pasqualetti, 2014 realizó un estudio con cerdos infectados con bajas cargas de *T. spiralis*, en el cual también evidenció un aumento del recuento de eosinófilos (%), en comparación con los cerdos controles, durante las semanas 1, 2, 3, 5 y 6 pi.

La ganancia de peso es una variable cuya evaluación resulta fundamental en la producción animal. En experiencias realizadas en cerdos (*Landrace-Yorkshire*) inoculados con *T. spiralis* se observaron diferencias significativas entre los cerdos

infectados y los cerdos del grupo control (p -valor <0.05) (Ribicich y col., 2007), sin embargo, esto se evidenció durante la fase crónica de la enfermedad. En dicho estudio, la variación de peso entre los cerdos infectados y los controles se evidenció a partir de los 20 d.p.i., observándose una pérdida de peso de entre el 10 al 15%. En la presente experiencia, solo fue estudiado el impacto durante la fase aguda de la enfermedad y no se encontraron diferencias en la ganancia de peso entre los jabalíes inoculados con *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y los animales controles. Esto está en concordancia con un estudio llevado a cabo por Lacour y col., 2013, quienes no observaron una variación en la ganancia de peso en jabalíes infectados con 200, 2000 y 20000 LM de *T. britovi* y con 20000 LM de *T. spiralis*. En otro estudio realizado por Sadun y Norman, 1956, en hamsters (*Cricetinae*) infectados con dosis crecientes de *T. spiralis* (100 y 500 LM) se observó una pérdida en la ganancia de peso que fue aún mayor en animales infectados con dosis mayores. Ellos observaron que esta relación entre la dosis infectiva y la pérdida de peso se comenzó a evidenciar ya en la primera semana p.i., y que a medida que procedió el estudio esto se acentuó. Esta misma asociación indirecta entre la dosis infectiva y la ganancia de peso se observó en cobayos infectados con *T. spiralis* (Castro y Olson, 1967). Ellos demostraron que aquellos animales infectados comenzaron a consumir menos cantidad de alimento y beber menos agua, en comparación con los animales no infectados (controles), como también, observaron que, al comparar la ganancia de peso entre los cobayos infectados y cobayos no infectados sometidos a una alimentación restrictiva, equivalente a la consumida por el cobayo infectado, igualmente tuvieron los infectados una menor ganancia de peso.

8.2. Distribución muscular

Varios autores demostraron que la distribución muscular de las LM de *Trichinella* spp. está principalmente influenciada por el hospedador, más que por la especie de *Trichinella* en sí (Kapel y col., 1998; Kapel y col., 2005), incluso en menor medida esto está influenciado por la edad y por el nivel de infección (Kapel y col., 2005). En múltiples estudios se ha evidenciado que las LM de este parásito tienen predilección por el diafragma y la lengua en jabalíes y en cerdos (Zimmermann y col., 1970; Kotula y col., 1984; Kapel y col., 1998; Serrano y col., 1999; Kapel, 2001; Kapel y col., 2005).

En los jabalíes infectados con *T. patagoniensis*, las larvas musculares fueron recuperadas principalmente del diafragma, lengua y paletas, sin embargo, no fueron recuperadas de los maseteros, y músculos intercostales de los animales analizados. Siendo este un dato relevante ya que estos músculos suelen estar parasitados en la infección por *T. spiralis*. Estudios realizados en cerdos infectados con esta misma

especie de *Trichinella*, demostraron también a la lengua como el principal músculo parasitado (Krivokapich y col., 2012). Este parásito suele afectar los músculos de mayor actividad y con mayor irrigación, como lo son el músculo deltoides, los pectorales, los músculos intercostales, la lengua, gastrocnemios, músculos de la laringe y el diafragma (Bruschi, 2021). En infecciones producidas por bajas cargas, estos músculos suelen ser los más parasitados, sin embargo, cuando las cargas infectivas fueron elevadas, las LM suelen distribuirse no uniformemente en más músculos, posiblemente en más cantidad en los músculos de predilección. En este estudio, la carga larvaria promedio encontrada entre todos los músculos analizados en cada uno de los jabalíes infectados, a la hora de realizar la digestión artificial, con *T. patagoniensis* fue en cada animal de 0,028, 0,0067 y de 0,0078 lpg. En un estudio realizado por Krivokapich y col., 2012, los cerdos infectados con *T. patagoniensis* presentaron una carga larvaria promedio de 0,0027, 0,0067 y 0,1569 lpg obtenida a partir de un pool de músculo estriado de cada cerdo, en ambos casos los niveles demostraron ser muy bajos en comparación a lo que se esperaría encontrar si dichos animales hubieran sido infectados con, por ejemplo, *T. spiralis*. Por este motivo, se podría inferir que los cerdos y los jabalíes utilizados en la presente experiencia, no serían buenos hospedadores de *T. patagoniensis*, ni tampoco una posible fuente de infección para el hombre. En un estudio realizado por Pasqualetti y col., 2014, en el cual esta especie de *Trichinella* fue utilizada para infectar 33 pollos domésticos (*Gallus gallus domesticus*) con 1000 LM, no se encontraron en ningún músculo analizado (pectorales, músculos de los miembros, músculo abdominal, músculos cervicales, músculos intercostales y lengua) LM, aunque sí se recuperaron adultos en la fase intestinal en los días 4, 5, 7, 11 y 14 p.i.

La lengua y el diafragma fueron los músculos más parasitados en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*. Por lo encontrado se podría sospechar y acordar con varios autores, que la distribución de las larvas musculares de *Trichinella* spp. depende principalmente de la especie animal afectada y no así de la especie de *Trichinella* involucrada. Resultados afines fueron obtenidos por Kapel 2000, Kapel 2001, Kapel y col., 2005, en jabalíes, cerdos y equinos. Un estudio realizado por Kapel y col., 2005, en zorros, jabalíes y equinos, encontraron que *T. pseudospiralis* presentaba una distribución muscular distinta a las especies encapsuladas evaluadas (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* y *T. nelsoni*), en el mismo encontraron que los músculos de predilección en esta especie fueron el diafragma, la paleta y el lomo.

En el presente estudio, el músculo esofágico fue el segundo más parasitado en los jabalíes infectados con *T. patagoniensis*, no así en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*. Esto podría estar correlacionado con el hallazgo encontrado por Pasqualetti, 2014, donde los cerdos parasitados con *T. spiralis* presentaron una gran

carga larvaria en el músculo estriado del esófago (en promedio por animal se encontró en dicho músculo 0,26, 17,51 y 9,74 lpg). Por ende, el estudio de órganos con composición muscular debería ser estudiado para ahondar, si estos podrían llegar a ser una fuente de infección para los animales y las personas.

Un estudio realizado por Ribicich y col., 2001, en el cual se analizaron cortes comerciales de músculos de cerdos parasitados con *T. spiralis*, demostraron que además de la lengua y el diafragma, el lomo, el jamón, y la paleta fueron los músculos más intensamente parasitados, seguidos por la bondiola, los intercostales y la panceta. Esto está también en concordancia con este estudio, en el cual tanto la bondiola, y la paleta presentaron una carga moderada de LM, no sólo en jabalíes infectados con *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis*, sino también en jabalíes infectados con *T. spiralis* (Bessi y col., 2021).

8.3. Tolerancia a la congelación de las larvas musculares

Algunos de los factores más influyentes sobre la capacidad de las L1 de *Trichinella* spp. a sobrevivir a la congelación son: el hospedador en el que se encuentran enquistadas, la edad de dicha larva muscular (ya que la cápsula de colágeno continúa engrosando a medida que la infección persiste), la temperatura y el periodo de tiempo en el que las larvas se encuentran bajo congelación (Pozio y col., 1994; Sacchi y col., 2001; Lacour y col., 2013). Estudios previamente realizados demostraron una correlación positiva entre la edad de las larvas musculares y la resistencia al frío en ratones infectados (Pozio y col., 1994; Malakauskas & Kapel, 2003), pero los autores concuerdan en que más estudios serían necesarios para afirmar esta propuesta. Un estudio realizado por Kapel y col., 2003, en el cual comparó la tolerancia a la congelación de LM de *T. nativa* de distinta edad en tejido de foca ocelada (*Pusa hispida*), observó que aquellas que habían estado infectando a las focas por 10 semanas sobrevivieron a -18 °C por 8 semanas, mientras que aquellas infectadas por 5 semanas sólo sobrevivieron a -18 °C por 1 semana. Ciertos autores proponen que la composición del tejido muscular de los animales salvajes les brinda a las larvas cierta protección contra la congelación (como por ejemplo el tipo y cantidad de lípidos presentes), a diferencia de lo que ocurriría en animales domésticos, cuya composición muscular difiere debido a encontrarse en diferentes condiciones ambientales (Dick, 1983). Además, la capacidad de las larvas musculares de tolerar la congelación podría también estar relacionada con los niveles de carbohidratos endógenos presentes en las mismas (Raines & Stewart, 1988; Lacour y col., 2013). Incluso, se ha observado que las LM que afectan a especies que habitan en el Ártico toleran por mayor tiempo la congelación (Dick, 1983; Kapel y col., 1999).

Como afirma Lacour y col., 2013, las infecciones en jabalíes podrían ser de mayor data en comparación a los cerdos productivos, ya que estos posiblemente tienen una mayor esperanza de vida, por este motivo, es posible que en dichos animales el desarrollo de la cápsula de colágeno pueda ser aún mayor que en los cerdos productivos, confiriéndoles así una mayor protección contra la congelación. En nuestra experiencia, las larvas de *T. pseudospiralis* demostraron baja tolerancia a la congelación, sobreviviendo por 48 horas a -20 °C en músculo de jabalí. Estos resultados coinciden con las características descritas anteriormente, la cual por tratarse de una especie de *Trichinella* spp. no encapsulada presenta una tolerancia al calor, resistencia a la congelación y una supervivencia en tejido en descomposición, menor a las especies encapsuladas (Kapel, 2000). La resistencia al frío de distintas especies de *Trichinella* spp. evaluada en músculos de cerdos, demostraron que *T. pseudospiralis* no sobrevive a -20.6 °C por 82 horas (Hill y col., 2009). En este estudio se utilizaron y establecieron distintas temperaturas de congelación con distintos tiempos mínimos de exposición a dichas temperaturas. Sin embargo, cabe aclarar que la forma en que fueron preparadas las muestras de carne antes de ser colocadas en los medios de congelación propuestos fue distinta, ya que las mismas previamente a ser congeladas fueron trituradas, para luego armar con esta carne triturada muestras de 2 mm de espesor. Otros investigadores que evaluaron la tolerancia a la congelación de larvas musculares de diferentes especies de *Trichinella* presentes en tejidos triturados de ratas encontraron que *T. pseudospiralis* tuvo la capacidad de sobrevivir menos de 1 semana a una temperatura de congelación de -18 °C (Malakauskas & Kapel, 2003). Sin embargo, Theodoropoulos y col (2000) indicaron que las larvas musculares de *T. pseudospiralis* en tejido muscular de oveja a -18 °C, se mantuvieron infectivas hasta por 4 semanas. Se han encontrado diferencias en la persistencia e infectividad de los diferentes isotipos de *T. pseudospiralis* en diferentes hospedadores animales (Theodoropoulos y col., 2000; Malakauskas y col., 2001; Malakauskas & Kapel, 2003).

La especie *T. pseudospiralis* fue encontrada en 18 diferentes especies de mamíferos y 13 especies de aves (Pozio, 2016; Pozio, 2005), este amplio rango de hospedadores permitiría a esta especie ampliar y mantener su distribución en el mundo a pesar de su baja tolerancia a las diversas condiciones ambientales en tejidos en descomposición (Pozio, 2016).

Hasta el momento, *T. patagoniensis* ha demostrado tener cierta tolerancia a la congelación en tejido muscular de gatos. Presentando viabilidad hasta 3 meses a -5 °C, pero no sobrevive a -18 °C (Krivokapich y col., 2012). Estos resultados son parciales, ya que aún no se ha podido clasificar la resistencia y persistencia a bajas temperaturas de esta especie de *Trichinella* spp. en distintas especies animales. En este estudio, su

tolerancia al congelamiento en músculos de ratones sometidos a -18 °C resultó ser baja ya que las larvas sólo sobrevivieron por 48 h a dicha temperatura. Esto sugiere que posiblemente la capacidad de tolerar la congelación de *T. patagoniensis* sea menor en comparación a *T. nativa* y *T. britovi* (Pozio and Murrell, 2006; Krivokapich y col., 2019). La especie *T. nativa* presenta una alta tolerancia a la congelación, sobre todo en tejidos de carnívoros, esta especie afecta principalmente carnívoros de la región del ártico y subártico (Dick and Belosevic, 1978, Worley y col., 1986; Kapel, 2000). Esta especie ha logrado sobrevivir hasta 4 años en tejidos congelados (-18 °C) de zorros árticos (*Alopex lagopus*) (Kapel y col., 1999), sin embargo, en tejidos musculares de otras especies animales, como los cerdos, ratones, roedores y jabalíes esta capacidad se pierde (Dick and Belosevic, 1978; Kapel, 2000; Malakauskas and Kapel, 2003). A su vez, *T. britovi* tiene la capacidad de sobrevivir a -20 °C en tejido de carnívoros hasta 6 meses (Pozio y col. 1989). Un estudio realizado en ovejas por Theodoropoulos y col., 2000, demostraron que *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* sobrevivieron hasta 4 semanas en tejido de oveja congelado a -5 °C y -18 °C.

A su vez, en un estudio realizado por Martinez y col., 2001, se demostró que la proteína Hsp70 presentó un comportamiento similar en las L1 de *T. spiralis*, *T. nativa* y *T. nelsoni* sometidas a una baja de temperatura, indicando que podrían así estar las Hsps (proteínas de choque térmico) involucradas en la resistencia a la congelación (Lopienska-Biernat y col., 2020)

8.4. Dinámica de anticuerpos

En lo referente a la cinética de anticuerpos, la totalidad de los jabalíes infectados seroconvirtieron antes de los 29 d.p.i. Resultados similares se encontraron en cerdos y jabalíes inoculados con diferentes especies, tanto domésticas como silvestres de *Trichinella* (Kapel and Gamble, 2000; Kapel, 2001). En el primer estudio, todos los cerdos infectados seroconvirtieron entre la tercera y cuarta semana p.i., al igual que los jabalíes infectados por Kapel, 2001, incluso en los animales en los cuales no se detectó ninguna LM en los músculos analizados. La rápida seroconversión observada en los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* en nuestra experiencia, no fue vista en experimentos previamente realizados con jabalíes, los cuales presentaron una seroconversión más lenta, entre la tercer y décima semana p.i., en comparación con otras especies de *Trichinella* spp. (Kapel, 2001). Kapel y Gamble, 2000, en los cerdos infectados con *T. pseudospiralis* también observaron un aumento más gradual de los niveles de anticuerpos, los cuales aumentaron desde la tercera semana hasta la semana 15 - 20 p.i.

Se sabe que la rapidez con la que se produce la seroconversión está asociada con el nivel de infección, sin embargo, los valores de OD del ELISA no se correlacionan directamente con la carga larvaria encontrada en el animal cuando ya se produjo la seroconversión (Bruschi y col., 2019).

A su vez, en los animales infectados con *T. patagoniensis* en los cuales no se logró detectar ninguna LM, igualmente se evidenció seroconversión. Esto podría deberse a una mayor respuesta inmune generada durante la fase intestinal de la enfermedad, sin embargo, son necesarios más estudios para aclarar estos aspectos. Se podría hipotetizar que esta podría llegar a ser una de las causas por las cuales menor cantidad de larvas se detectan a nivel muscular en esta especie de *Trichinella*, sin embargo, son necesarias mayores investigaciones. Santos y col., 2011, también observaron que la respuesta inmune provocada por *T. britovi* era mayor que la generada por *T. spiralis*, situación que podría explicar el por qué *T. britovi* presentó menor cantidad de larvas musculares enquistadas que en jabalíes infectados con *T. spiralis*. Esta situación también se observó en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*, en los cuales no se encontraron LM tras 10 semanas p.i., pero sus niveles de anticuerpos si aumentaron (Kapel, 2001). En cerdos infectados con *T. nativa*, se evidenció seroconversión, por más que no se aislaron LM (Nöckler y col., 2005), como también en cerdos infectados con bajas cargas de *T. spiralis* (Ribicich y col, 2007). Por todos estos resultados, se evidencia claramente la mayor sensibilidad que presenta la técnica de ELISA, en comparación con la técnica de digestión artificial para el diagnóstico de la trichinellosis, pudiéndose considerar así a esta técnica serológica muy relevante a la hora de realizar estudios de vigilancia epidemiológica. Cabe aclarar, que la misma debería estar luego acompañada de una técnica confirmatoria como lo es el Western Blot (Bruschi y col., 2019).

Los jabalíes infectados con *T. patagoniensis*, incluídos aquellos animales de los cuales no se recuperaron larvas musculares, demostraron títulos más elevados de anticuerpos que los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis*. Esta diferencia podría deberse a que *T. pseudospiralis* es una especie de *Trichinella* no encapsulada, y, por ende, estimularía de forma diferente al sistema inmune del huésped, generando así un título de anticuerpos menor a las especies encapsuladas de *Trichinella* (Kapel, 2001), sin embargo, más estudios serían necesarios para evaluar esta diferencia. Por otro lado, los animales inoculados con *T. patagoniensis* tras alcanzar el pico en su dinámica de anticuerpos, su título comenzó a descender, mientras que los jabalíes inoculados con *T. pseudospiralis* luego de alcanzar su pico de anticuerpos, mantuvieron en meseta sus valores hasta el final de la experiencia.

8.5. PCR en tiempo real

Algunos estudios experimentales realizados en equinos y porcinos han logrado detectar tempranamente esta enfermedad por medio del empleo de técnicas moleculares (deVos y col., 1988; Perret y col., 1998). En la presente Tesis Doctoral, los resultados encontrados fueron variables, tanto entre cebadores como entre las especies de *Trichinella* analizadas. Una de las posibles razones de esto, se debería a la variabilidad que se genera tras la toma de muestra. La detección de una larva recién nacida o un fragmento de la misma es aleatorio, por lo cual, no necesariamente el resultado negativo significa un animal sano, sino más bien que dicha muestra fue negativa. Otros autores también presentaron detecciones discontinuas de ADN de larvas recién nacidas a lo largo del período ventana (Uparanukraw & Morakote, 1997; Li y col., 2010; Krivokapich, 2012). La capacidad de detectar ADN circulante en gran medida va a depender de la carga larvaria circulando como también de la cantidad de sangre muestreada para la extracción de dicho ADN (Uparanukraw & Morakote, 1997). Debido a esto, esta técnica tendría mayor utilidad para confirmar esta enfermedad, más que para descartar la infección del animal. En los estudios generados en la presente Tesis, no se encontró ADN parasitario en cerdos o jabalíes infectados con *T. patagoniensis* ni con *T. pseudospiralis*, en todas las muestras de suero analizadas. Otra posible hipótesis, podría deberse a la respuesta inmune que haya desencadenado cada animal. En este estudio, se evidenció una rápida seroconversión, a partir de las dos semanas p.i., lo cual también podría conllevar a una menor cantidad de LRN migrando generandose así una menor chance de detección de las mismas. Al comparar los dos marcadores entre sí, también se evidenciaron claras diferencias en su capacidad de detección. El análisis de los sueros de *T. spiralis* en jabalíes, sugiere una mayor sensibilidad de detección del cebador Rep respecto al 18S. El Rep presenta una mayor detección en comparación con el 18S. Esta situación fue algo similar a lo ocurrido en otro estudio realizado por Krivokapich, 2012, en el cual se evidenció que el cebador Rep presentó alrededor de diez veces mayor sensibilidad en la detección, en comparación con el cebador ITS2, posiblemente debido al número de copias que posee cada marcador. Por este mismo motivo, se podría inferir que la sensibilidad de detección del 18S es menor, lo que llevaría a la falta de detección de ADN de *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* en las muestras analizadas. El cebador Rep al ser utilizado para detectar ADN de todos los genotipos de *Trichinella* demostró no lograr detectar ADN circulante en estudios realizados previamente por Krivokapich (comunicación personal), incluso Li y col, 2010, demostraron por Southern Blot, que la secuencia de ADN de *T. pseudospiralis* se hibridiza débilmente con cebadores derivados de la secuencia de 1.6 kb de *T. spiralis*.

Por esos motivos, en este estudio se utilizó el Rep solamente para detectar ADN de *T. spiralis*.

La detección temprana de esta enfermedad fue más ampliamente estudiada en ratones. Li y col., 2010, demostraron que la detección varió en función a la dosis inoculada, en los ratones con mayor dosis infectiva lograron un rango de detección mayor en comparación con aquellos con menor dosis infectiva. En aquellos inoculados con 300 LM, lograron detectar ADN circulante entre los 5 a 15 d.p.i., mientras que, en los inoculados con 20 LM, sólo detectaron entre los 5 a 6 d.p.i. Un estudio realizado por Caballero-García y Cardoso, 2001, lograron detectar ADN de *T. spiralis* en ratones inoculados experimentalmente en un mayor rango, ya que se detectó desde los 5 a los 17 d.p.i. utilizando también como cebador al elemento repetitivo 1.6 kb, pero por medio de una PCR convencional seguida por el uso de sonda Taq. Krivokapich, 2012, utilizando este mismo cebador Rep, logró detectar ADN de larvas recién nacidas en ratones infectados experimentalmente con *T. spiralis* entre los 5 a los 19 d.p.i., logrando así detectar un mayor rango de detección por utilizando una PCR en tiempo real. En otro estudio realizado en ratones por Uparanukraw & Morakote, 1997, lograron detectar ADN parasitario entre los 5 a 14 d.p.i. con solamente uno de los dos cebadores bajo estudio. Los cebadores procedieron uno del gen P49 y el otro de una región del elemento repetitivo 1.6 kb. Este último fue el que logró detectar ADN del parásito. La posible causa de esta diferencia en el nivel de detección entre cebadores, también se correspondería a la diferencia en el número de copias, siendo el cebador proveniente del elemento repetitivo 1.6 kb mucho mayor que el del cebador proveniente del gen P49. A su vez, dentro de este estudio, se evidenciaron diferencias en la detección en función al lugar del cual se extrajo la muestra de sangre, esta diferencia fue observada por primera vez en este estudio. En aquellos ratones de los cuales las muestras de sangre habían sido extraídas mediante punción cardíaca, se logró detectar en todas las fechas (5 a 14 d.p.i.), mientras que de los ratones de los cuales la sangre se extrajo de la cola, solamente se logró detectar ADN entre los 5 a 7 d.p.i. Sin embargo, un estudio realizado por Li y col., 2010, en el cual también se tomaron muestras de sangre extraídas de la cola de ratones infectados con *T. spiralis*, se logró detectar ADN parasitario entre los 5 a 17 d.p.i. en aquellos ratones inoculados con 300 L1. Por otro lado, Robert y col, 1996, también lograron detectar ADN de *T. spiralis* circulante en sangre de personas infectadas, pero con la particularidad que dicho ADN fue detectado ya durante la fase muscular de la enfermedad (4-6 semanas p.i.). Estas personas se habrían infectado tras un brote en París por el consumo de carne de caballos. En este estudio, se evaluaron a 37 personas, a las cuales no se les habría administrado ningún tratamiento. Del total, solo dos pacientes resultaron positivos para la PCR, utilizando también el elemento

repetitivo 1.6 kb específico de *T. spiralis*. Se sabe que particularmente las hembras de *Trichinella* spp. alojadas en el intestino delgado producen aproximadamente 1500 larvas en los 5 a 10 días posteriores a la infección, y dicha duración en el intestino es variable en función a la especie animal, por ejemplo, en ratas y ratones suele ser de 10 a 20 días, mientras que en humanos puede llegar a extenderse hasta las 4 a 6 semanas p.i. o incluso más tiempo (Campbell, 1983; Wakelin and Denham 1983; Bell, 1998; Li y col, 2010). Un estudio realizado en equinos infectados experimentalmente logró detectar ADN de larvas recién nacidas desde los 6 hasta los 14 d.p.i. utilizando el elemento repetitivo 1.6 kb por medio de una PCR convencional (Perret y col., 1998). En dicho estudio además se evidenció una fuerte respuesta inmune intestinal ya que tras una reinfección no se logró detectar ADN circulante en estos mismos animales.

9. Conclusiones

Estos resultados permiten evaluar como *T. patagoniensis* y *T. pseudospiralis* se comportaron en las infecciones experimentales de jabalíes.

Con respecto a *T. patagoniensis*, tras los resultados obtenidos se podría sospechar que los jabalíes y los cerdos no serían hospedadores predilectos de esta especie. Por este motivo, dichos animales no implicarían una importante fuente de infección de *T. patagoniensis* para el hombre, ya que la fase muscular no siempre ocurre, incluso ante dosis infectivas altas, como se logró evidenciar en este estudio.

En los jabalíes bajo estudio, ninguno presentó signos clínicos de esta enfermedad, a pesar de haber sido inoculados con altas dosis. Este hecho resalta la importancia del análisis de cada animal que se va a destinar a consumo humano, con el fin de evitar brotes de esta enfermedad.

En este estudio se implementaron varias técnicas diagnósticas, donde cada una permitió evaluar diferentes etapas de la parasitosis en jabalíes. Con la utilización de la digestión artificial uno de los aspectos que se buscó evidenciar fue si la fase muscular de esta enfermedad ocurría tras la infección con cada una de las especies de *Trichinella* en estudio. En la mayoría de los jabalíes infectados con *T. patagoniensis* la fase muscular no logró evidenciarse, sin embargo, si se desarrolló en los jabalíes infectados con *T. pseudospiralis*. Al realizar la técnica serológica de ELISA, se pudo determinar el momento en el cual los jabalíes comenzaron a desarrollar serología positiva, evidenciándose esto por medio de la seroconversión del título de anticuerpos. En los

animales analizados, esto comenzó a ocurrir unas 2 semanas p.i., independientemente del nivel de infección que posteriormente se observaría en la musculatura de cada animal. Esta técnica, por su mayor sensibilidad logró detectar como positivos a los animales en los cuales las cargas larvianas en la musculatura eran muy bajas o negativas. Tras los resultados obtenidos, se podría concluir que esta técnica se puede utilizar para mapear la circulación de este parásito en diversas regiones del país, considerándose, así como una herramienta fundamental a la hora de realizar estudios de vigilancia epidemiológica. Con respecto a la detección de ADN parasitario por medio de una PCR en tiempo real, se logró evidenciar su presencia en algunas fechas de muestreo en los jabalíes infectados. Sus resultados aún son variables, por ende, se hace necesario seguir evaluando la sensibilidad y especificidad de esta técnica, y considerar el uso de nuevos cebadores para aumentar la detección de larvas recién nacidas de *Trichinella* spp. en diferentes especies de animales infectados. Sin embargo, esta técnica puede proponerse como una herramienta valiosa para la detección temprana de LRN de *Trichinella* en suero, en la carne de cerdo u otros tejidos animales. La importancia de todas y cada una de estas técnicas radica en la prevención de la trichinellosis en los seres humanos.

La comparación de diversos métodos diagnósticos nos permitió ahondar en cómo se desarrolla esta enfermedad, comenzar a construir nuevas estrategias para tratar de prevenir esta parasitosis y de esta manera evitar los efectos negativos de esta zoonosis en la población.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sumar aportes y continuar con las investigaciones, para comprender diversos aspectos sobre esta enfermedad en las diferentes especies animales que se utilizan para consumo humano y de esta forma contribuir a la prevención.

10. Bibliografía

Alicata, J.E., Burr G.O. (1949). Preliminary observations on the biological effects of radiation on the life cycle of *Trichinella spiralis*. *Science*, 109 (1949), pp. 595-596

Alicata, J.E. (1951). Effects of roentgen radiation on *Trichinella spiralis* J. *Parasitol.*, 37 (1951), pp. 491-501

Alonso, M., Herrero, B., Vieites, J. M., & Espiñeira, M. (2011). Real-time PCR assay for detection of *Trichinella* in meat. *Food Control*, 22(8), 1333-1338.

Ancelle, T. (1998) History of trichinellosis outbreaks linked to horse meat consumption, 1975–1998 *Eurosurveillance* 3, 86–89.

Anónimo, (2013). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf

Bass, D. A., & Szejda, P. (1979). Eosinophils versus neutrophils in host defense: Killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by human granulocytes in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 64(5), 1415-1422.

Beiting, D.P., Park, P.W., Appleton, J.A. (2006). Synthesis of syndecan-1 by skeletal muscle cells is an early response to infection with *Trichinella spiralis* but is not essential for nurse cell development. *Infection and Immunity*, 74 (2006), pp. 1941-1943.

Bell, R. G. (1998). The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Advances in Parasitology*, 41, 149-217.

Bessi, C., Ercole, M. E., Fariña, F. A., Ribicich, M. M., Montalvo, F., Acerbo, M., Krivokapich, S.J., & Pasqualetti, M. I. (2021). Study of *Trichinella patagoniensis* in wild boars. *Veterinary Parasitology*, 297, 109166.

Boireau, P., Vallee, I., Roman, T., Perret, C., Mingyuan, L., Gamble, H. R., & Gajadhar, A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Veterinary parasitology*, 93(3-4), 309-320.

Bolas-Fernandez, F., Albarran-Gomez, E., Navarrete, I., Martinez-Fernandez, A.R., (1993). Dynamics of porcine humoral responses to experimental infections by spanish

Trichinella isolates: comparison of three larval antigens in ELISA. J. Vet. Med. Ser. B 40, 229–238.

Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. (2004). Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. Parasitology 2004, 128:323-332.

Boonmars T, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, (2005). What is the role of p53 during the cyst formation of *Trichinella spiralis*? A comparable study between knockout mice and wild type mice. Parasitology 2005, 131:705-712.

Blum, L.K., Mohanan, S., Fabre, M.V., Yafawi, R.E., Appleton, J.A., (2013). Intestinal infection with *Trichinella spiralis* induces distinct, regional immune responses. Vet. Parasitol. 194 (2- 4), 101105.

Brake, R.J., Murrell, K.D., Ray, E.E., Thomas, J.D., Muggenburg, B.A., Sivinski, J.S. (1985). Destruction of *Trichinella spiralis* by low-dose irradiation of infected pork. J. Food Saf., 7 (3) (1985), pp. 127-143

Bruschi, F., Gómez-Morales, M. A., & Hill, D. E. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *Food and Waterborne Parasitology*, 14, e00032.

Bruschi, F. (Ed.). (2021). *Trichinella and trichinellosis*. Elsevier.

Caballero-Garcia M.L & Jiménez-Cardoso E. (2001). Early detection of *Trichinella spiralis* infection by the Polymerase Chain Reaction in blood samples of experimentally infected mice. Parasite, 2001. 8: S229-S231.

Campbell, W.C. (1983). *Trichinella* and Trichinosis. Plenum Press, New York/London (1983)

Castro, G. A., & Olson, L. J. (1967). Relationship between Body Weight and Food and Water Intake in *Trichinella spiralis*-Infected Guinea Pigs. The Journal of Parasitology, 53(3), 589. doi:10.2307/3276723.

Castro, G. A., Badialaceves, F., Adams, P. R., Copeland, E. M., & Dudrick, S. J. (1976). Response of immunized, parenterally nourished rats to challenge infection with the nematode, *Trichinella spiralis*. *The Journal of Nutrition*, 106(10), 1484-1491.

Curran, J., Baillie, D. L., & Webster, J. M. (1985). Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. *Parasitology*, 90(1), 137-144.

Dame, J. B., Murrell, K. D., Worley, D. E., & Schad, G. A. (1987). *Trichinella spiralis*: genetic evidence for synanthropic subspecies in sylvatic hosts. *Experimental parasitology*, 64 (2), 195-203.

Davidson, R.K., Ørpetveit, I., Møller, L., Kapel, C.M. (2009). Serological detection of anti-*Trichinella* antibodies in wild foxes and experimentally infected farmed foxes in Norway. *Vet. Parasitol.*, 163 (2009), pp. 93-100

Denkers, E. Y., Hayes, C. E., & Wassom, D. L. (1991). *Trichinella spiralis*: influence of an immunodominant, carbohydrate-associated determinant on the host antibody response repertoire. *Experimental parasitology*, 72(4), 403-410.

deVos, T., Klassen, G. R., & Dick, T. A. (1988). Sequence analysis of a 1.6 kb repetitive element from a porcine isolate of *Trichinella spiralis*. *Nucleic acids research*, 16(7), 3114.

Dick, T. A., & Belosevic, M. (1978). Observations on a *Trichinella spiralis* isolate from a polar bear. *The Journal of Parasitology*, 64(6), 1143-1145.

Dick, T. A. (1983). Infectivity of isolates of *Trichinella* and the ability of an arctic isolate to survive freezing temperatures in the raccoon, *Procyon lotor*, under experimental conditions. *Journal of wildlife diseases*, 19(4), 333-336.

Della Bella, C., Benagiano, M., De Gennaro, M., Gomez-Morales, M.A., Ludovisi, A., D'Elios, S., y col., (2017). T-cell clones in human trichinellosis: evidence for a mixed Th1/Th2 response. *Parasite Immunol.* 39 (3), e12412.

Deepthi, B., Prayaga, A. K., & Rukmangadha, N. (2022). Comparison of modified ultrafast giemsa stain with the standard may grunwald giemsa stain in FNAC of various organs. *Journal of Cytology*, 39(4), 174.

Despommier DD, Aron L, Turgeon L. (1975). *Trichinella spiralis*: growth of the intracellular (muscle) larva. *Exp Parasitol* 1975, 37:108-116.

Despommier DD (1983) Biology. In: Campbell WC (ed) *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York, pp 75–151.

Despommier, D. D. (1993). *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *The Journal of parasitology*, 472-482.

Dubey, J.P., Thayer, D.W. (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J. Parasitol.*, 80 (1994), p. 764

Dupouy-Camet, J., Bruschi, F., 2007. Management and diagnosis of human trichinellosis. In: Dupouy-Camet, J., Murrell, K.D. (Eds.), *FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis*. World Organization for Animal Health Press, Paris, pp. 37–69.

Dorak, M. T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. Taylor & Francis.

Ercole, M. E., Bessi, C., Pasqualetti, M. I., Ribicich, M. M., Aronowicz, T., Bonboni, A., Fariña, F. A. (2020). Gamma radiation effect on *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* infected wild boar meat. *Veterinary parasitology*, 287, 109257.

Escalante, M., Romari's, F., Rodríguez, M., y col., (2004). Evaluation of *Trichinella spiralis* larva group 1 antigens for serodiagnosis of human trichinellosis. *J. Clin. Microbiolol.* 42, 40604066. Available from: <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4060-4066.2004>.

European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union L*, 212 (2015), pp. 7-34.

European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC). (2019). The European Union one health 2018 zoonoses report. *EFSa Journal*, 17(12), e05926.

Fabre, V., Beiting, D. P., Bliss, S. K., Gebreselassie, N. G., Gagliardo, L. F., Lee, N. A., Lee, J. J., y Appleton, J. A. (2009). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *The Journal of Immunology*, 182(3), 1577-1583.

Fariña, F. A., Pasqualetti, M. I., Cardillo, N. M., Aronowicz, T., Ercole, M., Krivokapich, S. J., & Ribicich, M. M. (2016). Evaluación de la transmisión galactógena de *Trichinella patagoniensis* en ratones BALB/c. *Revista argentina de microbiología*, 48(2), 101-104.

Farina, F., Pasqualetti, M., Ilgová, J., Cardillo, N., Ercole, M., Aronowicz, T., S. Krivokapich, M. Kašný & Ribicich, M. (2017). Evaluation of the infectivity and the persistence of *Trichinella patagoniensis* in muscle tissue of decomposing guinea pig (*Cavia porcellus*). *Parasitology research*, 116, 371-375.

Fariña, F. A. (2018). Estudios experimentales en ratones BALB/cy cobayos de una nueva especie: *Trichinella patagoniensis* N. SP.(Nematoda).

Farkas, J. (1998). Irradiation as a method for decontaminating food: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 44 (3) (1998), pp. 189-204

Feidas, H., Kouam, M. K., Kantzoura, V., & Theodoropoulos, G. (2014). Global geographic distribution of *Trichinella* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, 255-266.

Flores-Pérez, I., Gonzalez, G.F., E. Sciutto, de Aluja, A.S. (2003). Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestodes. *Parasitol. Res.*, 90 (2003), pp. 203-208

Fonseca-Salamanca, F., Nogal-Ruiz, J.J., Benito, C., Camacho, M. V., Martínez-Fernández, A.R., (2006). Molecular characterization of *Trichinella* genotypes by Inter-Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction (Issr-Pcr). *J. Parasitol.* 92, 606–610.

Gajadhar, A. A., Noeckler, K., Boireau, P., Rossi, P., Scandrett, B., & Gamble, H. R. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations for quality assurance in digestion testing programs for *Trichinella*. *Food and waterborne parasitology*, 16, e00059.

Gamble, H.R., (1995). Trichinellosis. In: OIE Biological Standards Commission (Ed.), *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. List A and B Diseases of*

Mammals, Birds, and Bees, fifth ed. Office International des Epizooties, Paris, pp. 477–480.

Gamble, H.R., Patrascu, I. V., (1996). Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *J. Food Prot.* 59, 1213–1217.

Gamble, H.R., Gajadhar, A.A., Solomon, M.B. (1996). Methods for the detection of trichinellosis in horses. *J. Food Prot.*, 59 (1996), pp. 420-425

Gamble, H. R., Bessonov, A. S., Cuperlovic, K., Gajadhar, A. A., Van Knapen, F., Noeckler, K., Schenone & Zhu, X. (2000). International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary parasitology*, 93(3-4), 393-408.

Gamble, H. R., Pozio, E., Bruschi, F. A. B. R. I. Z. I. O., Nöckler, K., Kapel, C. M. O., & 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(1), 3-13.

Gamble, H. R. (2015). Trends in food production practices relative to foodborne parasites. *Foodborne parasites in the food supply web*, 11-22.

Gamble, H. R., Alban, L., Hill, D., Pyburn, D., & Scandrett, B. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on pre-harvest control of *Trichinella* in food animals. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00039.

Gebreselassie, N. G., Moorhead, A. R., Fabre, V., Gagliardo, L. F., Lee, N. A., Lee, J. J., & Appleton, J. A. (2012). Eosinophils preserve parasitic nematode larvae by regulating local immunity. *The Journal of Immunology*, 188(1), 417-425.

Gibbs, H. C., MacQueen, K. F., & Pullin, J. W. (1961). The effects of cobalt 60 radiation on *Trichinella spiralis* in meat. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne de Sante'e Publique*, 52(6), 232-240.

Gómez-Morales, M. A., Ludovisi, A., Pezzotti, P., Amati, M., Cherchi, S., Lalle, M., ... & Pozio, E. (2009). International ring trial to detect anti-*Trichinella* IgG by ELISA on pig sera. *Veterinary Parasitology*, 166(3-4), 241-248.

Gould, S. E., Gomberg, H. J., Villella, J. B., & Hertz, C. S. (1957). Studies on *Trichinella Spiralis*: VI. Effects of Cobalt-60 and X-Ray on Morphology and Reproduction. *The American Journal of Pathology*, 33(1), 79.

Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 127-145.

Helmbj, H., & Grecis, R. K. (2003). Contrasting roles for IL-10 in protective immunity to different life cycle stages of intestinal nematode parasites. *European journal of immunology*, 33(9), 2382-2390.

Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M., (2009). Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 167, 111. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>.

Hill, D.E., Forbes, L., Zarlenga, D.S., Urban, J.F., Gajadhar, A.A., Gamble, H.R., (2009). Survival on north American genotypes of *Trichinella* in frozen pork. *J. Food Prot.* 72, 2565-2570.

Hill, D.E., Luchansky, J.B., Porto Fett, A.C., Gamble, H., Juneja, V.K., Fournet, V.M., Hawkins Cooper, D.S., Holley, R., Gajadhar, A., Dubey, J.P., (2017). Curing conditions to inactivate *Trichinella spiralis* muscle larvae in ready-to-eat pork sausage. *Food and Waterborne Parasitology.* 6, 1–8.

Huang, L., Gebreselassie, N. G., Gagliardo, L. F., Ruyechan, M. C., Lubber, K. L., Lee, N. A., Lee, J.J., & Appleton, J. A. (2015). Eosinophils mediate protective immunity against secondary nematode infection. *The Journal of Immunology*, 194(1), 283-290.

Huang, L., & Appleton, J. A. (2016). Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends in parasitology*, 32(10), 798-807.

Ilić, N., Gruden-Movsesijan, A., Živojinović, M., & Sofronić-Milosavljević, L. (2014). Characteristic band pattern in western blots for specific detection of anti-antibodies in different host species. *Acta Veterinaria*, 64(1), 33-43.

Ishikawa, Goyal, Mahida, & Wakelin. (1998). Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology*, 93(2), 257-263.

Jasmer, D. P., Bohnet, S., & Prieur, D. J. (1991). *Trichinella* spp.: differential expression of acid phosphatase and myofibrillar proteins in infected muscle cells. *Experimental parasitology*, 72(3), 321-331.

Jasmer DP, (1993). *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J Cell Biol* 1993, 121:785-793.

Jiménez Heredia, I., Quiñones Pérez, C., Ojeda Durán, F. J., Matínez-Pinna Vallejo, E., Gaudó Hernández, M., & Vega-Pla, J. L. (2020). Análisis de curvas de fusión de alta resolución para la tipificación de la mutación de la abiotrofia cerebelar equina. *Sanidad Militar*, 76(1), 8-12.

Kapel, C. M., Henriksen, S. A., Dietz, H. H., Henriksen, P., & Nansen, P. (1994). A study on the predilection sites of *Trichinella spiralis* muscle larvae in experimentally infected foxes (*Alopex lagopus*, *Vulpes vulpes*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35(2), 125.

Kapel, C. M. O., Henriksen, S. A., Berg, T. B., & Nansen, P. (1995). *Trichinella* infections in arctic foxes from Greenland: studies and reflections on predilection sites of muscle larvae. *Journal of Helminthology*, 69(4), 325-330.

Kapel, C. M. O., Webster, P., Lind, P., Pozio, E., Henriksen, S. A., Murrell, K. D., & Nansen, P. (1998). *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. *Parasitology research*, 84, 264-271.

Kapel, C. M. O., Pozio, E., Sacchi, L., & Prestrud, P. (1999). Freeze tolerance, morphology, and RAPD-PCR identification of *Trichinella nativa* in naturally infected arctic foxes. *The Journal of parasitology*, 144-147.

Kapel, C. M. (2000). Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Vet. Parasitol.*, 93(3-4), 263-278.

Kapel, C.M.O., Gamble, H.R. (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *International Journal for Parasitology*. 30, 215-221.

Kapel, C. M. (2001). Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *The Journal of parasitology*, 309-314.

Kapel, C. M. O., Measures, L., Møller, L. N., Forbes, L., & Gajadhar, A. (2003). Experimental *Trichinella* infection in seals. *International journal for parasitology*, 33(13), 1463-1470.

Kapel, C. M., Webster, P., & Gamble, H. R. (2005). Muscle distribution of sylvatic and domestic *Trichinella* larvae in production animals and wildlife. *Vet Parasitol.*, 132(1-2), 101-105.

Khan, W. I., Blennerhasset, P., Ma, C., Matthaei, K. I., & Collins, S. M. (2001). Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite immunology*, 23(1), 39-42.

Khan, W.I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P.A., Humphreys, N.E., Grecis, R.K., y col., (2003). Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect. Immun.* 71 (5), 24302438.

Knight, P. A., Pemberton, A. D., Robertson, K. A., Roy, D. J., Wright, S. H., & Miller, H. R. (2004). Expression profiling reveals novel innate and inflammatory responses in the jejunal epithelial compartment during infection with *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 72(10), 6076-6086.

Kocięcka (2000). Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet. Parasitol.*, 93 (2000), pp. 365-383.

Kotula, A. W., Murell, K. D., Acosta-Stein, L., & Lamb, L. (1984). Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in selected muscles and organs of experimentally infected swine. *Journal of animal science*, 58(1), 94-98.

Kotula, A. W., Sharar, A. K., Paroczay, E., Gamble, H. R., Murrell, K. D., & Douglass, L. (1990). Infectivity of *Trichinella spiralis* from frozen pork. *Journal of food protection*, 53(7), 571-574.

Krivokapich, S. J., González Prous, C. L., Gatti, G. M, Confalonieri, V., Molina, V., Matarasso, H., Guarnera, E., (2008). Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. *Vet. Parasitol.*, 156, 234 – 240.

Krivokapich, S.J, Pozio, E, Gatti, G.M., Gonzalez Prous, C.L., Ribicich, MM, Marucci, G, La Rosa, G, Confalonieri, V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n.sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivore mammals in South America. *International Journal of Parasitology*.

Krivokapich, S. J., Prous, C. L. G., Gatti, G. M., & Saldía, L. (2015). First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical region. *Veterinary parasitology*, 208(3-4), 268-271.

Krivokapich, S. J., Arbusti, P. A., Ayesa, G. E., Gonzalez Prous, C. L., Gatti, G. M., & Saldía, L. (2019). Estudio serológico de un presunto brote causado por el consumo de carne de puma infectada con *Trichinella patagoniensis* en El Calafate, Santa Cruz (Argentina). *Revista Argentina de Parasitología*, 8.

Lacour, S. A., Heckmann, A., Macé, P., Grasset-Chevillot, A., Zanella, G., Vallée, I., Kapel, CM.O., & Boireau, P. (2013). Freeze-tolerance of *Trichinella* muscle larvae in experimentally infected wild boars. *Veterinary parasitology*, 194(2-4), 175-178.

La Rosa, G., Marucci, G., Rosenthal, B. M., & Pozio, E. (2012). Development of a single larva microsatellite analysis to investigate the population structure of *Trichinella spiralis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 369-376.

Lee, M., Sebranek, J. G., Olson, D. G., & Dickson, J. S. (1996). Irradiation and packaging of fresh meat and poultry. *Journal of Food Protection*, 59(1), 62-72.

Li, C. K., Seth, R., Gray, T., Bayston, R., Mahida, Y. R., & Wakelin, D. (1998). Production of proinflammatory cytokines and inflammatory mediators in human intestinal epithelial cells after invasion by *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*, 66(5), 2200-2206.

Li F, Wang ZQ, Cui J. (2010). Early detection by polymerase chain reaction of migratory *Trichinella spiralis* larvae in blood of experimentally infected mice. *Foodborne Pathog Dis*, 2010. 8:887-892.

Łopieńska-Biernat, E., Stryński, R., Polak, I., Pawlikowski, B., Pawlak, J., & Podolska, M. (2020). Effect of freezing on the metabolic status of L3 larvae of *Anisakis simplex* ss. *Infection, Genetics and Evolution*, 82, 104312.

Malakauskas, A., Kapel, C. M. O., & Webster, P. (2001). Infectivity, persistence and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. *Parasite*, 8, S216-S222.

Malakauskas, A., & Kapel, C. M. (2003). Tolerance to low temperatures of domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in rat muscle tissue. *Journal of Parasitology*, 89(4), 744-748.

A. Malakauskas, V. Paulauskas, P. Keidans, T. Järvis, C. Eddi, C.M.O. Kapel. (2007). Molecular epidemiology of *Trichinella* spp. in the three Baltic countries: Lithuania, Latvia and Estonia. *Parasitol. Res.*, 100 (2007), pp. 687-693

Marti, H.P., Murrell, K.D., (1986). *Trichinella spiralis*: antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp. Parasitol.* 62 (3), 370-375.

Martinez, J., Perez-Serrano, J., Bernadina, W. E., & Rodriguez-Caabeiro, F. (2001). Stress response to cold in *Trichinella* species. *Cryobiology*, 43(4), 293-302.

Matsuo A, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, (2000). Five types of nuclei present in the capsule of *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 2000, 121:203-210.

McCoy, O.R., (1931). Immunity of rats to reinfection with *Trichinella spiralis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 484-494.

Merialdi, G., Bardasi, L., Fontana, M. C., Fioretti, D. P., Cirone, F., y col. (2011). Evaluation of serological and molecular techniques for diagnosis of *Trichinella* infections in pigs. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), 58–63.

Mitreva, M., & Jasmer, D. P. (2006). Biology and genome of *Trichinella spiralis*.

Møller, L. N., Petersen, E., Gamble, H. R., & Kapel, C. M. O. (2005). Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. *Veterinary parasitology*, 132(1-2), 81-84.

Moloney, A., Denham, D.A., (1979). Effects of immune serum and cells on newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* 1 (1), 312.

Moqbel, R., Wakelin, D., MacDonald, A.J., King, S.J., Grecis, R.K., Kay, A.B., (1987). Release of leukotrienes during rapid expulsion of *Trichinella spiralis* from immune rats. *Immunology* 60 (3), 425-430

Morales, M.A., Mele, R., Sanchez, M., Sacchini, D., De Giacomo, M., Pozio, E., (2002). Increased CD8(1)-T-cell expression and a type 2 cytokine pattern during the muscular phase of *Trichinella* infection in humans. *Infect. Immun.* 70 (1), 233239.

Murrell, K. D. (1985). *Trichinella spiralis*: acquired immunity in swine. *Experimental Parasitology*, 59(3), 347-354.

Murrell, K. D., & Dubey, J. P. (1991). Epidemiology and control of trichinellosis and toxoplasmosis. In *Use of irradiation to control infectivity of food-borne parasites. Proceedings of a Final Research Coordination Meeting, Mexico* (pp. 73-79).

Murrell, K. D., Lichtenfels, R. J., Zarlenga, D. S., & Pozio, E. (2000). The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 293-307.

Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E., & Takahashi, Y. (1999). Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 29(7), 1113-1120.

Nishiyama, T., Araki, T., Mizuno, N., Wada, T., Ide, T., & Yamaguchi, T. (1992). Detection of circulating antigens in human trichinellosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(3), 292-293

Nöckler, K., Serrano, F. J., Boireau, P., Kapel, C. M., & Pozio, E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.*, 132(1-2), 85-90.

Nöckler, K., Kapel, C.M.O. (2007). Detection and surveillance for *Trichinella*: meat inspection and hygiene and legislation. En: Dupouy-Camet, J., Murrell, K.D. (Eds). *FAO/WHO/OIE. Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis.* Paris. 69-97.

Noeckler, K., Pozio, E., van der Giessen, J., Hill, D. E., & Gamble, H. R. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals. *Food and Waterborne Parasitology*, 14, e00041.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2018). Trichinellosis. Recuperado el 10 de mayo de 2023, de <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/trichinellosis>.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2021). Trichinellosis. Recuperado el 29 de agosto de 2023, <https://www.who.int/es/publications/i/item/WHO-UCN-NTD-VVE-2021.7>

Oltean, M., Gavrea, R., Dumitrache, M., Băguț, T., Gherman, C. M., Cozma, V., & Györke, A. (2012). Characterization of host-parasite interactions during the experimental *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Helminthologia*, 49, 139-146.

Ortega-Pierres, M. G., Yopez-Mulia, L., Homan, W., GAMBLE, H. R., Lim, P. L., Takahashi, Y., Wassom, D.L., & Appleton, J. A. (1996). Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite immunology*, 18(6), 273-284.

Pasqualetti, M.I., Acerbo, M., Miguez, M., Rosa, A., Fariña, F., Cardillo, N., Degregorio, O.J., Ribicich, M. (2014). Nuevos aportes al conocimiento de *Trichinella* y trichinellosis. *Rev Med Vet (B Aires)* 2014, 95 (2):12 – 21.

Pasqualetti, M., F. Fariña, E. Falzoni, N. Cardillo, T. Aronowicz, S. Krivokapich, A. Rosa, M. Ribicich. (2014). Susceptibility of chickens (*Gallus gallus domesticus*) to *Trichinella patagoniensis*. *Vet. Parasitol.*, 205 (1-2), pp. 397-400.

Pasqualetti, M. I., Fariña, F. A., Krivokapich, S. J., Gatti, G. M., Daneri, G. A., Varela, E. A., S. Lucero, M. E. Ercole, C. Bessi, M. Winter & Ribicich, M. M. (2018). *Trichinella spiralis* in a South American sea lion (*Otaria flavescens*) from Patagonia, Argentina. *Parasitology research*, 117(12), 4033-4036.

Perret C, Vallet C, Fabien JF, Boireau P., Soule C. (1998). Circulating New Born Larvae Are An Early Marker Of *Trichinella Spiralis* Horse Infection., *Poster Sessions / Parasitology International*, 1998. 47: 283-389.

Polvere, R. I., Kabbash, C. A., Capó, V. A., Kadan, I., & Despommier, D. D. (1997). *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Experimental parasitology*, 86(3), 191-199.

Pozio, E., La Rosa, G., Rossi, P., & Fico, R. (1989). Survival of *Trichinella* muscle larvae in frozen wolf tissue in Italy. *The Journal of Parasitology*, 75(3), 472-473.

Pozio, E., La Rosa, G. & Amati, M. (1994) Factors influencing the resistance of *Trichinella* muscle larvae to freezing. pp. 173 – 178 in Campbell, W.C., Pozio, E. & Bruschi, F. (Eds) *Trichinellosis*. Rome, Italy, Istituto Superiore di Sanità Press.

Pozio, E., & Kapel, C. M. O. (1999). *Trichinella* nativa in sylvatic wild boars. *Journal of Helminthology*, 73(1), 87-89.

Pozio, E., Paterlini, F., Pedarra, C., Sacchi, L., Bugarini, R., Goffredo, E., & Boni, P. (1999). Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *Journal of helminthology*, 73(3), 233-237.

Pozio, E. (2005). The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold-to warm-blooded animals. *Veterinary parasitology*, 132(1-2), 3-11.

Pozio, E., Zarlenga, D. S., (2005). Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Internacional Journal for Parasitology*. 35, 1191 – 1204.

Pozio, E., & Murrell, K. D. (2006). Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advances in parasitology*, 63, 367-439.

Pozio, E., (2007). World distribution of *Trichinella* spp. Infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*. 149, 3-21.

Pozio, E. (2013). The opportunistic nature of *Trichinella*—exploitation of new geographies and habitats. *Veterinary parasitology*, 194(2-4), 128-132.

Pozio, E., Zarlenga, D.S., (2013). New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology*. 3 (2013) 983 – 997.

Pozio, E. (2015). *Trichinella* spp. imported with live animals and meat. *Veterinary Parasitology*, 213(1-2), 46-55.

Pozio, E., (2016). *Trichinella pseudospiralis* an elusive nematode. *Vet. Parasitol.* 231, 97-101.

Pozio, E., & Zarlenga, D. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae. *Food and Waterborne Parasitology*, 15, e00033.

Quse, V., Falzoni, E. (2008). *Patología en fauna silvestre*. Fundación Temaikèn. Primera edición. Vazquez Manzini editores.

Radovic, I., Gruden-Movsesijan, A., Ilic, N., Mostarica-Stojkovic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2012). *Trichinella spiralis* shares epitopes with human autoantigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 503-509.

Raines, K. M., & Stewart, G. L. (1988). Carbohydrate reserves and infectivity in *Trichinella spiralis* isolated from carrion. *Parasitology*, 96(3), 533-541.

Reichard, M. V., Logan, K., Criffield, M., Thomas, J.E., Paritte, J.M., Messerly, D.M., Interisano, M., Marucci, G., Pozio, E., (2017). The occurrence of *Trichinella* species in the cougar *Puma concolor* cougar from the state of Colorado and other regions of North and South America. *J. Helminthol.* 91, 320–325.

Ribicich, M., Miguez, M., Argibay, T., Basso, N., & Franco, A. (2001). Localization of *Trichinella spiralis* in muscles of commercial and parasitologic interest in pork. *Parasite*, 8, S246-S248.

Ribicich, M., Miguez, M., Rosa, A., Torno, H., Basso, N., & Franco, A. (2004). Efficacy of microwave cooking to inactivate *Trichinella spiralis* larvae in pork. *VETERINARIA ARGENTINA*, (201), 30-71.

Ribicich, M., Gamble, H.R., Bolpe, J., Rosa, A., Franco, A. (2005). Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet. Parasitol.*, 132 (1-2) 137-142.

Ribicich, M., Gamble, H. R., Rosa, A., Sommerfelt, I., Marquez, A., Mira, G., Franco, A. (2007). Clinical, haematological, biochemical and economic impacts of *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Vet. Parasitol.*, 147(3-4), 265-270.

Ribicich M, Gamble HR, Bolpe J, Sommerfelt I, Cardillo N, Scialfa, E, y col. (2009). Evaluation of the risk of transmiión of *Trichinella* in pork production Systems of Argentina. *Vet. Parasitol.*, 2009; 159:350- 353

Ribicich, M, Gamble, HR, Bolpe, J, Scialfa, E, Mundo, S, Pasqualetti, M; Cardillo, N, San Martin,9C, Vizio, E, Borrás, P, Fariña, F, Rosa, A. (2011). Diagnosis of Trichinellosis by Elisa Test with three types of antigens of *Trichinella spiralis* in pigs raised under different conditions of confinement. *The Pig Journal*. Volume 66. December 2011.

Ribicich, M., Falzoni, E., Rosa, A., (2012). Diagnostico parasitológico. En *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en veterinaria* (A. Rosa, M. Ribicich, Ed). Hemisferio Sur. Pp 291-300.

Ribicich, M., Krivokapich, S., Pasqualetti, M., Prous, C. G., Gatti, G. M., Falzoni, E., Rosa, A. (2013). Experimental infection with *Trichinella* T12 in domestic cats. *Vet. Parasitol.*, 194(2), 168-170.

Ribicich, M. M., Farina, F. A., Aronowicz, T., Ercole, M. E., Bessi, C., Winter, M., & Pasqualetti, M. I. (2021). Reprint of: A review on Trichinella infection in South America. *Veterinary Parasitology*, 297, 109540.

Robert, F., Houze, S., Cabie, A., & Dupouy-Camet, J. (1996). Detection by polymerase chain reaction of *Trichinella spiralis* larvae in blood of infected patients. *Parasite*, 3(4), 391-393.

Rosa, A., Ribicich, MM., (2012), *Parasitología y enfermedades parasitarias en veterinaria*, Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur S.A.

Rostami, A., Khazan, H., Kazemi, B., Kia, E. B., Bandepour, M., Taghipour, N., & Mowlavi, G. (2017). Prevalence of *Trichinella* spp. infections in hunted wild boars in northern Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 46(12), 1712.

Sadun, E. H., & Norman, L. (1956). Effect of Single Inocula, of Varied Size, on the Resistance of Hamsters to *Trichinella spiralis*. *The Journal of Parasitology*, 42(6), 608. doi:10.2307/3274880

Santos, J. A. G., López, I. S., Martín, J. E. P., & Aguilera, F. J. S. (2011). Serological detection of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in wild boar by ELISA using an excretor-secretor antigen and a crude antigen. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología*, 70(1), 49-57.

SENASA, 2017. Informes mensuales de faena y Comisos. Buenos Aires, Argentina.

SENASA, 2020. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_trichinellosis_2010_2019.pdf

SENASA, 2021. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/informe-con-analisis-de-las-notificaciones-de-trichinellosis-entre-2010-y-2019>

SENASA, 2022. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/informe_triqui_2022_final.pdf

Serrano, F. J., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., Navarrete, I., & Kapel, C. M. O. (1999). Influence of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. *Journal of Helminthology*, 73(3), 251-254.

Sivinski, J. S., & Switzer, R. K. (1985). Low-dose irradiation: a promising option for trichina-safe pork certification. In *Radiation disinfection of food and agricultural products*.

Wang, Z., Hao, C., Zhuang, Q., Zhan, B., Sun, X., Huang, J., Yuli Cheng & Zhu, X. (2020). Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 11, 563784.

Worley, D. E., Seese, F. M., Espinosa, R. H., & Sterner, M. C. (1986). Survival of sylvatic *Trichinella spiralis* isolates in frozen tissue and processed meat products. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9), 1047-1049.

World Organization for Animal Health – OIE, (2017). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, CH 2.1.20. Trichinellosis Infection with *Trichinella* spp. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.20_TRICHINELLOSIS.pdf

Wu Z, Matsuo A, Nakada T, Nagano I, Takahashi Y, (2001). Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology* 2001, 123:85-94.

Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y, (2005). A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology* 2005, 130:561-573.

Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, (2008). Candidate genes responsible for common and different pathology of infected muscle tissues between *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitol Int* 2008, 57:368-78.

Wu, Z., Sofronic-Milosavljevic, L., Nagano, I., & Takahashi, Y. (2008). *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasites & vectors*, 1(1), 1-14.

Sacchi, L., Corona, S., Gajadhar, A. A., & Pozio, E. (2001). Ultrastructural characteristics of nurse cell-larva complex of four species of *Trichinella* in several hosts. *Parasite*, 8, S54-S58.

Sharma, R., Thompson, P. C., Hoberg, E. P., Scandrett, W. B., Konecsni, K., Harms, N. J., Kukka P. M., Jung T. S, Elin B., Mulders R., Larter N. C., Branigan M., Pongracz J., Wagner B., Kafle P., Lobanov V. A., Rosenthal B. M. & Jenkins, E. J. (2020). Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *International journal for parasitology*, 50(4), 277-287.

Smith, H.J. (1988). Comparison of Pepsin-digestion and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Trichinosis in Swine. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1988; 52: 63 – 66.

Soule y col., 1989b. C. Soule, J. Dupouy Camet, P. Georges, T. Ancelle, J.P. Gillet, J. Vaissaire, A. Delvigne, E. Plateau (1989). Experimental trichinellosis in horses: biological and parasitological evaluation. *Vet. Parasitol.*, 31 pp. 19-36.

Steel, N., Faniyi, A.A., Rahman, S., Swietlik, S., Czajkowska, B.I., Chan, B.T., y col., (2019). TGF β -activation by dendritic cells drives Th17 induction and intestinal contractility and augments the expulsion of the parasite *Trichinella spiralis* in mice. *PLoS Pathog* 15 (4), e1007657.

Steward GL, Read CP: Change in RNA in mouse trichinosis. *J Parasitol* 1973, 59:997-1005.

Sukhdeo, M. V. K., and N. A. Croll (1981). Gut propulsion in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J. Parasitol.* 67: 906–910.

Theodoropoulos, G., Kapel, C. M. O., Webster, P., Saravanos, L., Zaki, J., & Koutsotolis, K. (2000). Infectivity, predilection sites, and freeze tolerance of *Trichinella* spp. in experimentally infected sheep. *Parasitology research*, 86, 401-405.

Tomašovičová, O., Čorba, J., Havasiova, K., Ryboš, M., & Štefančíková, A. (1991). Experimental *Trichinella spiralis* infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 40(1-2), 119-126.

Underwood, W., Anthony, R., Gwaltney-Brant, S., Poison, A. S. P. C. A., & Meyer, R. (2013). AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2013 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association.

Uparanukraw P and Morakote N. (1997). Detection of circulating *Trichinella spiralis* larvae by polymerase chain reaction. *Parasitol Res*, 83:52–56.

USDA, 2018. FSIS compliance guideline for the prevention and control of *Trichinella* and other parasitic hazards in pork products. <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/2ca75475-3efd-4fa7-8f34-7393c245a1df/Trichinella-Compliance-Guide-03162016.pdf?MOD=AJPERES>.

Vallance, B. A., P. A. Blennerhassett, and S. M. Collins. (1997a). Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *Am. J. Physiol.* 272 (Gastrointest. Liver Physiol. 35): G321–G327.

Vallance, B. A., J. D. Huizinga, and S. M. Collins. (1997b). C-kit receptor: its role in the intestinal response to infection and inflammation (Abstract). *Gastroenterology* 112: A1109.

Vallance, B.A., Croitoru, K., Collins, S.M. (1998). T lymphocyte-dependent and -independent intestinal smooth muscle dysfunction in the *T. spiralis*-infected mouse. *Am. J. Physiol.* 275 (5), G1157G1165.

Walls, R.S., Carter, R.L., Leuchars, E., Davies, A.J. (1973). The immunopathology of trichiniasis in T-cell deficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 13 (2), 231-242.

Wang, N., Bai, X., Ding, J., Lin, J., Zhu, H., Luo, X., FU, Z., Zhu, C., Jia, H., Liu, M., & Liu, X. (2021). *Trichinella* infectivity and antibody response in experimentally infected pigs. *Veterinary parasitology*, 297, 109111.

Wakelin, D., & Denham, D. A. (1983). The immune response. *Trichinella and trichinosis*, 265-308.

Wassom, D.L., Dougherty, D.A., Krco, C.J., David, C.S. (1984a). H-2-controlled, dose-dependent suppression of the response that expels adult *Trichinella spiralis* from the small intestine of mice. *Immunology* 53 (4), 811-818.

Wassom, D.L., Wakelin, D., Brooks, B.O., Krco, C.J., David, C.S. (1984b). Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis* infections of mice. Hypothesis to explain the role of H-2 genes in primary and challenge infections. *Immunology* 51 (4), 625-631.

Wikerhauser, T., Kucic, V., Razem, D., Orsanic, L., & Besvir, J. (1993). Irradiation to control infectivity of *Toxoplasma gondii* in murine brains and edible porcine tissues. In *Use of irradiation to control infectivity of food-borne parasites*.

World Health Organization (1989). La irradiación de los alimentos: una técnica para conservar y preservar la inocuidad de los alimentos. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

World Organisation for Animal Health (2018). Chapter 8.17, infection with *Trichinella* spp. In: Terrestrial Animal Health Code. Paris, France.

Wu, Z., Matsuo, A., Nakada, T., Nagano, I., & Takahashi, Y. (2001). Different response of satellite cells in the kinetics of myogenic regulatory factors and ultrastructural pathology after *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infection. *Parasitology*, 123(1), 85-94.

Xu, D., Wu, Z., Nagano, I., & Takahashi, Y. (1997). A muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* is intracellular, but does not form a typical cyst wall. *Parasitology International*, 46(1), 1-5.

Yang, Y., Cai, Y. N., Tong, M. W., Sun, N., Xuan, Y. H., Kang, Y. J., Isabelle Vallée ^d, Pascal Boireau ^d, Shi peng Cheng ^c, & Liu, M. Y. (2016). Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health*, 2, 25-30.

Yera, H., Andiva, S., Perret, C., Limonne, D., Boireau, P., & Dupouy-Camet, J. (2003). Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(5), 793-796.

Zarlenga, D. S., Chute, M. B., Martin, A., & Kapel, C. M. (1999). A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 29(11), 1859-1867.

Zarlenga, D. S., Rosenthal, B. M., La Rosa G., Pozio, E., Hoberg, E. P. (2006). Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *PNAS*, 2006.

Zarlenga, D., Thompson, P., Pozio, E. (2020). *Trichinella* species and genotypes. *Res. Vet. Sci.* 133 (2020), 289296.

Zimmermann, W. J. (1970). Reproductive potential and muscle distribution of *Trichinella spiralis* in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 156, 770-774.

11. Anexos

Técnica de digestión artificial

Para esta técnica se utiliza* (Gamble y col., 2000, Rosas y Ribicich, 2012):

Líquido de digestión:

- Ácido clorhídrico (0,1 a 1,0%, 15 ml).
- Pepsina (1:10,000 National Standard Formulary strength) (15 g).
- Agua (1500 ml a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$)

* Para digerir 100g de músculo.

Instrumentos:

- Vasos de precipitados.
- Agitador magnético.
- Filtro (de diámetro de poro de 180–355 μm meshes).
- Ampolla de Squibb.
- Tubo Falcon.
- Balanza.
- Placa de Petri.
- Picadora.

Detección temprana de larvas recién nacidas por PCR en tiempo real

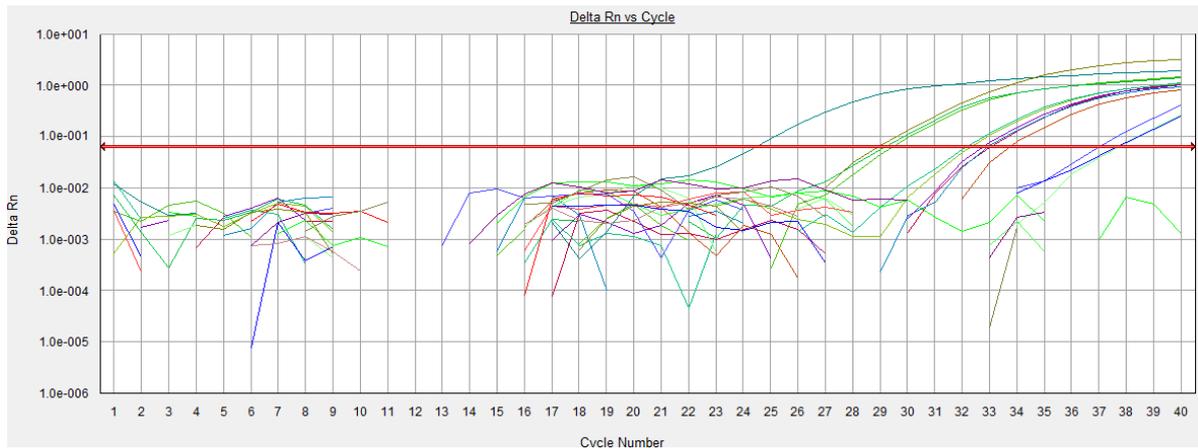


Gráfico 6. Curva de amplificación de los sueros de jabalíes infectados con *T. spiralis* 7 d.p.i. analizados con el cebador Rep y el 18S por PCRrt, utilizando 1 μ l de ADN de cada muestra.

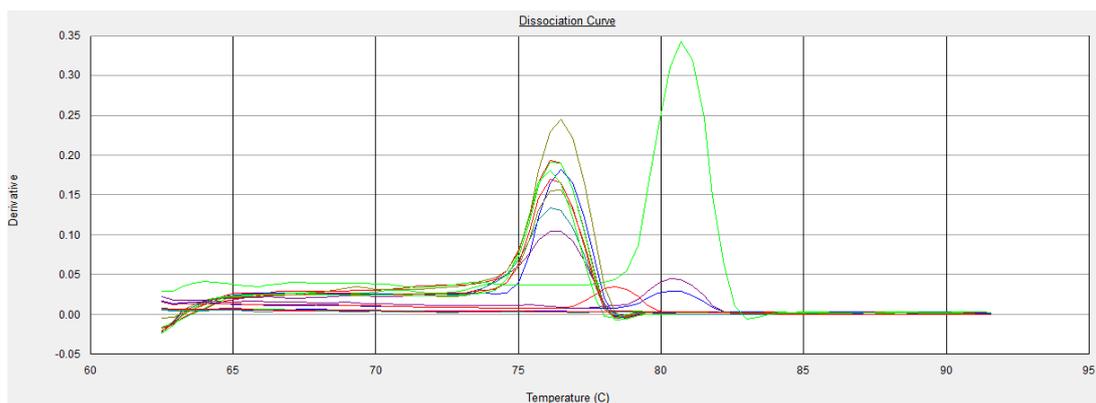


Gráfico 7. Curva de disociación de los sueros de jabalíes 7 d.p.i. infectados con *T. spiralis* analizados con el cebador Rep y 18S por PCRrt, utilizando 1 μ l de ADN de cada muestra.

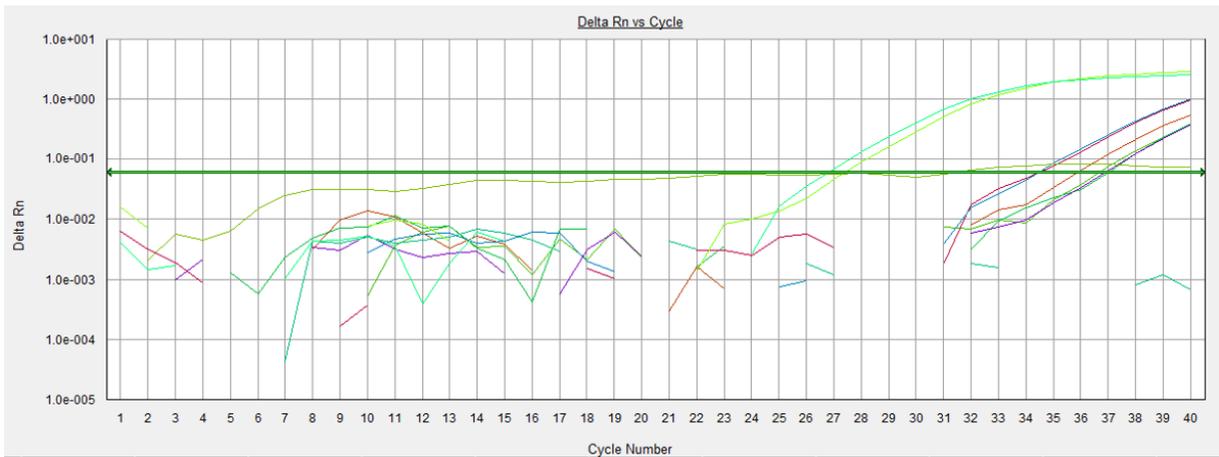


Gráfico 8. Curva de amplificación de los sueros de jabalíes 7 d.p.i. con *T. spiralis* analizados con el cebador 18S por PCRrt, utilizando 5 μ l de ADN de cada muestra.

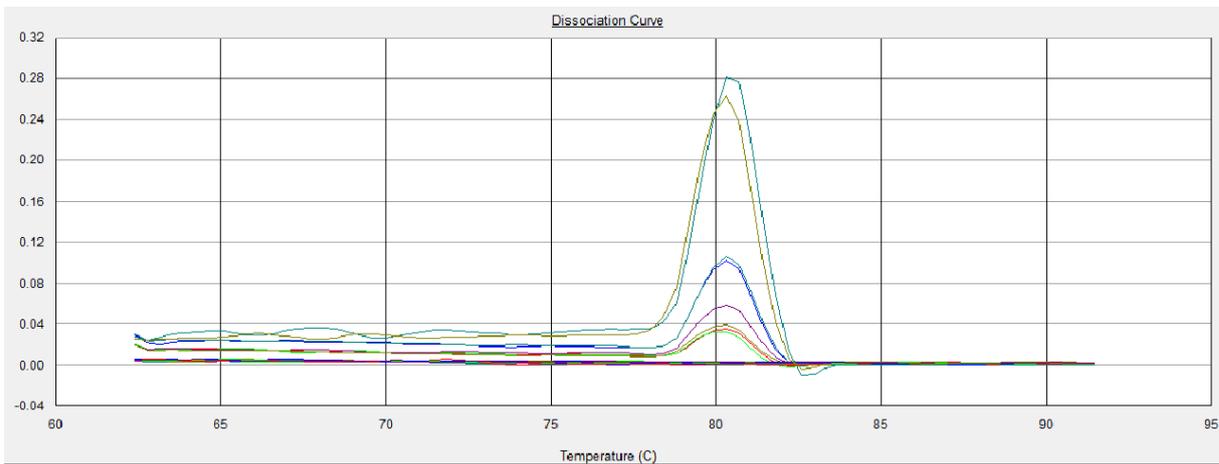


Gráfico 9. Curva de disociación de los sueros de jabalíes 7 d.p.i. infectados con *T. spiralis* analizados con el cebador 18S por PCRrt, utilizando 5 μ l de ADN de cada muestra.

Producción científica

Artículos científicos

Revistas con referato

Bessi, C.; Ercole, M. E.; Fariña, F. A.; Ribicich, M. M.; Montalvo, F.; Acerbo, M.; Krivokapich, S.J.; Pasqualetti, M. I. (2021). “**Study of *Trichinella patagoniensis* in wild boars**”. *Veterinary Parasitology*, 109166. Volume 297, September 2021.

Ribicich, M. M.; Fariña, F. A.; Aronowicz, T.; Ercole, M. E.; Bessi, C.; Winter, M., Pasqualetti, M. I. (2021). “**A review on *Trichinella* infection in South America**”. *Veterinary Parasitology*, 109540.

Fariña, F. A., Pasqualetti, M. I., Ercole, M. E., Bessi, C., & Ribicich, M. (2021). “**Eucoleosis por *Eucoleus boehmi* en un canino con elevadas cargas parasitarias**”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(3).

Fariña, F. A.; Pasqualetti, M. I.; Bessi, C.; Ercole, M. E.; Vargas, C.; Arbusti, P.; Ayesa, G; Ribicich, M. M. (2020). “**Comparison between *Trichinella patagoniensis* and *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice**”. *Veterinary Parasitology*, 286, 109248.

Ercole, M. E.; Bessi, C.; Pasqualetti, M. I.; Ribicich, M. M.; Aronowicz, T., Bonboni, A.; Acervo, M.; Fariña, F. A. (2020). “**Gamma radiation effect on *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis* infected wild boar meat**”. *Veterinary Parasitology*, 287, 109257.

Pasqualetti, MI; Fariña, FA; Krivokapich, SJ; Gatti, GM; Daneri, GA; Varela, EA; Lucero, S; Ercole, ME; Bessi, C; Winter, M; Ribicich, MM. “***Trichinella spiralis* in a South American sea lion (*Otaria flavescens*) from Patagonia, Argentina**”. *Parasitology Research*. December 2018, Volume 117, Issue 12, pp 4033–4036.

Libro

Parásitos en peces de consumo de Argentina (2021). Alvarez, Marcela Alejandra; Ribicich, M. Mabel; Timi, Juan Tomás; Viozzi Gustavo. GRUPO AD

HOC "PARÁSITOS EN PRODUCTOS PESQUEROS" Red de Seguridad Alimentaria Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Red de Seguridad Alimentaria RSA. CONICET. ISBN: 978-987-25861-2-6. Capítulo 7

Presentaciones en eventos científicos

UNA SALUD. Primeras Jornadas Interdisciplinarias. "**Detección temprana de la infección por *Trichinella* spp. en jabalíes experimentalmente infectados**". Clara Bessi, Fernando Fariña, Silvio Krivokapich, Graciana Gatti, Mariano Ercole, Francisco Montalvo, Marcelo Acerbo, Mabel Ribicich, Mariana Pasqualetti. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 25 y 27 de octubre de 2023. Comunicación oral.

UNA SALUD. Primeras Jornadas Interdisciplinarias. "**Acciones comunitarias tendientes a generar conciencia sobre la trichinellosis**". Mariana Pasqualetti, Mabel Ribicich, Clara Bessi, Francisco Montalvo, Camila Mendoza, Evelyn Arispe, Sofía Campi, Fernando Fariña. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 25 y 27 de octubre de 2023. Poster.

15th International Conference on Trichinellosis. "**Early detection of *Trichinella* infection through real-time PCR analysis in experimentally infected pigs and wild boars**". Bessi, C, Fariña, FA, Krivokapich, SJ, Gatti, G, Ercole, ME, Montalvo, F, Acerbo, M, Ribicich, MM, Pasqualetti, MI. Belgrado, Serbia. Agosto, 2023.

15th International Conference on Trichinellosis. "**Survival of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* in experimentally infected wild boar muscle tissue under freezing and environmental conditions**". Bessi, C, Ercole, ME, Fariña, FA, Montalvo, F, Fassa, V, Acerbo, M, Ribicich, MM, Pasqualetti, MI. Belgrado, Serbia. Agosto, 2023.

15th International Conference on Trichinellosis. "**Comparison of the adult stage distribution pattern of three *Trichinella* species during the intestinal phase in CF1 mice**". Montalvo, F, Mendoza, C, Bessi, C, Fariña, FA, Ribicich, MM, Volpedo, A, Pasqualetti, MI. Belgrado, Serbia. Agosto, 2023.

XII Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Detección de larvas recién nacidas de *Trichinella* spp. en animales infectados experimentalmente**”. Clara Bessi, Fernando Fariña, Silvio Krivokapich, Graciana Gatti, Mariano Ercole, Francisco Montalvo, Marcelo Acerbo, Mabel Ribicich, Mariana Pasqualetti. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2023. Comunicación oral.

XII Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Determinación experimental de la persistencia de larvas musculares de *Trichinella spiralis* y *Trichinella pseudospiralis* en embutidos de carne porcina**”. Ercole M, Bessi C, Montalvo F, Cuntin S, Pasqualetti MI, Ribicich MM, Fariña FA. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2023. Poster.

XI Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Determinación experimental de la persistencia de larvas musculares de *Trichinella spiralis* y *Trichinella pseudospiralis* en embutidos de carne porcina**”. Mariano Ercole, Clara Bessi, Francisco Montalvo, Santiago Cuntin, Mariana Pasqualetti, Mabel Ribicich, Fernando Fariña. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2022.

XI Jornadas de Jóvenes Investigadores. “**Determinación experimental de la persistencia de larvas musculares de *Trichinella patagoniensis* en embutidos de carne porcina**”. Ercole M, Bessi C, Montalvo F, Pasqualetti MI, Ribicich M, Fariña F. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2022. Comunicación breve oral.

XI Jornadas de Jóvenes Investigadores. “**Evaluación del empleo de Cloruro de sodio para la preservación de muestras de Cobayo (*Cavia Porcellus*) infectadas con *Trichinella patagoniensis***”. Cuntin S, Ercole M, Bessi C, Montalvo F, Fariña F, Ribicich M, Pasqualetti MI., Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2022. Comunicación breve oral.

XI Jornadas de Jóvenes Investigadores. “**Fase Intestinal de la infección experimental de ratones CF1 con *T. pseudospiralis*: Resultados preliminares**”. Montalvo F, Fariña F, Ercole M, Bessi C, Cuntin S, Ribicich M, Pasqualetti MI.. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 9 y 10 de junio de 2022. Comunicación breve oral.

X Jornadas de Jóvenes Investigadores. “**Dinámica de anticuerpos de jabalíes infectados con diferentes especies de *Trichinella* spp.**” Bessi C, Ercole ME, Montalvo F, Acerbo M, Fabbi Pablo, Ribicich MM, Fariña FA, Pasqualetti MI. Facultad

de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Utilización de una técnica alternativa de digestión artificial (*PrioCHECK Trichinella AAD*) para el diagnóstico de *Trichinella* spp. en carne de jabalí (*Sus scrofa*)**”. Fariña FA, Bessi C, Acerbo M, Montalvo F, Ercole M, Ribicich MM, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Estudio de la dinámica parasitaria en ovinos de raza frisona del tambo ovino de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires**”. Chometowski S., Ercole M., Anacoreto M., Bessi C., Sesto I., Ribicich M., Coppola M., Pasqualetti M.I. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Efecto de la radiación gamma sobre *Trichinella pseudospiralis* y *Trichinella spiralis* en carne de jabalí Facultad de Ciencias Veterinarias**”. Ercole M., Bessi C., Montalvo F., Pasqualetti M.I., Ribicich M., Fariña F. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Evaluación del empleo de cloruro de sodio para la preservación de muestras de carne porcina infectada con *Trichinella spiralis*. diseño experimental**”. Cuntin S, Ercole M, Bessi C, Montalvo F, Fariña F, Ribicich M, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Estudio de la capacidad infectiva de *Trichinella spiralis* en chacinados elaborados con carne de cerdo: diseño experimental**”. Cuntin S, Ercole M, Bessi C, Montalvo F, Fariña F, Ribicich M, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

X Jornadas De Jóvenes Investigadores. “**Caracterización de la fase intestinal y sistémica de *Trichinella spiralis*, *T. pseudospiralis* y *T. patagoniensis* en ratones CF1. Diseño experimental**”. Montalvo F, Fariña F, Ercole M, Bessi C, Cuntin S, Ribicich

M, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. 3 y 4 de junio de 2021, Buenos Aires, Argentina.

Jornadas UBATIC+ II, conformadas por el V Encuentro Anual Internacional de la Red de la Universidad del Futuro y el II Encuentro Virtual sobre Tecnologías y Educación en el Nivel Superior: Prácticas creativas en escenarios extraordinarios. **“Utilización de redes sociales en la formación continua de estudiantes y profesionales veterinarios en enfermedades parasitarias”**. Mariano Emmanuel Ercole; Clara Bessi; Mariana Inés Pasqualetti; Fernando Adrián Fariña; Miriam Mabel Ribicich. Realizadas del 3 al 6 de noviembre de 2020.

15th International Conference on Trichinellosis. **“*Trichinella patagoniensis* in wild boars: a first approach”**. Bessi C, Ercole ME, Fariña FA, Ribicich MM, Bonboni A, Acerbo M, Krivokapich SJ, Pasqualetti MI. Cluj-Napoca, Rumania. Agosto, 2019.

15th International Conference on Trichinellosis. **“Experimental study in wild boars infected with *Trichinella patagoniensis*, *T. pseudospiralis* and *T. spiralis*”**. Bessi C, Ercole ME, Fariña FA, Ribicich MM, Bonboni A, Montalvo F, Acerbo M, Krivokapich SJ, Pasqualetti MI. Cluj-Napoca, Rumania Agosto, 2019.

15th International Conference on Trichinellosis. **“Gamma radiation effect on *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* infected wild boars meat”**. Ercole ME, Bessi C, Pasqualetti MI, Ribicich MM, Aronowicz T, Montalvo F, Acerbo M, Fariña FA. Cluj-Napoca, Rumania Agosto, 2019.

15th International Conference on Trichinellosis. **“*Trichinella spiralis* in *Otaria flavescens* from Patagonia, Argentina”**. Pasqualetti MI, Fariña FA, Krivokapich SJ, Gatti GM, Daneri GA, Varela EA, Lucero S, Ercole ME, Bessi C, Winter M, Ribicich MM. Cluj-Napoca, Rumania Agosto, 2019.

15th International Conference on Trichinellosis. **“Trichinellosis scenarios in people, domestic and wild animals in South America”**. Ribicich MM, Fariña FA, Aronowicz t, Ercole ME, Bessi C, Pasqualetti MI. Cluj-Napoca, Rumania Agosto, 2019.

15th International Conference on Trichinellosis. **“Intestinal phase approach of *Trichinella patagoniensis* in BALB/c mice”**. Fariña FA, Pasqualetti MI, Ercole ME,

Bessi C, Montalvo F, Vargas C, Krivokapich SJ, Ribicich MM. Cluj-Napoca, Rumania Agosto, 2019.

XXVII Jornadas de Jóvenes Investigadores da Associação de Universidades Grupo Montevideo - AUGM. **Evaluación de la irradiación sobre larvas musculares de *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* en músculo de jabalíes.** Ercole M.; Bessi C. Del 23 a 25 de octubre del 2019. En Universidade Federal de Sao Carlos - UFSCar, Brasil. Poster

IX Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Comparación del patrón de distribución larvaria de *Trichinella patagoniensis*, *T. pseudospiralis*, *T. spiralis* en jabalíes (*Sus scrofa*)**” Bessi C, Ercole M, Fariña F, Acerbo M, Ribicich MM, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 7 de junio de 2019.

IX Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Estudio de persistencia ambiental de larvas L1 de *T. spiralis* en tejido muscular de jabalí**”. Bonboni A, Ercole M, Bessi C, Fariña F, Montalvo F, Ribicich M, Pasqualetti MI. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 7 de junio de 2019.

IX Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Evaluación de metodologías de preservación e inactivación de *Trichinella* spp. en carnes de origen animal**”. Ercole M, Bessi C, Pasqualetti MI, Ribicich M, Fariña F. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 7 de junio de 2019.

IX Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Evaluación de la signología clínica, perfil eosinofílico y ganancia de peso, en jabalíes (*Sus scrofa*) con trichinellosis, criados en confinamiento total**”. Montalvo F, Ercole M, Bessi C, Acerbo M, Miguez M, Pillado S, Pasqualetti M, Fariña F, Ribicich MM. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 7 de junio de 2019.

V Jornadas Interdisciplinarias, Ciclo del Agua en Agroecosistemas. **Parásitos clásicos y emergentes presentes en el agua: situación actual y factores de riesgo.** Pasqualetti, M, Fariña, F, Bessi, C, Ercole, M, Rosa, A, Ribicich, M. 14, 15 y 16 de noviembre de 2018. Facultad de Ciencias Veterinarias-UBA. Buenos Aires, Argentina. Presentación Oral.

IV Encuentro de Docentes de Parasitología en Ciencias Veterinarias. **Nuevas experiencias en el abordaje didáctico de la parasitología y las enfermedades parasitarias en la enseñanza de grado y posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.** Ribicich MM, Rosa A, Pasqualetti M, Fariña F, Vizio E, Bolpe J, Aronowicz T, Pérez M, Ercole M, Bessi C, Borrás P, Bonboni A, Montalvo F, Vaccaro M. Dpto. Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Noviembre de 2018. Río Cuarto, Córdoba. 978-987-688-333-7

IV Encuentro de Docentes de Parasitología en Ciencias Veterinarias. **Formación de recursos humanos e interdisciplina: bases para la investigación en parasitología veterinaria en la FCV.** UBA. Ribicich Mm, Pasqualetti M Fariña F, Acerbo M, Vizio E, Bolpe J, Aronowicz T, Winter M, Ercole M, Bessi C, Bonboni A, Montalvo F, Rosa A. Dpto. Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Noviembre de 2018. Río Cuarto, Córdoba. 978-987-688-333-7

IV Encuentro de Docentes de Parasitología en Ciencias Veterinarias. **Promoción de la educación integrada a través de la extensión universitaria.** Pasqualetti M, Fariña F, Acerbo M, Ercole M, Bessi C, Aronowicz T, Bonboni A, Montalvo F, Córdoba M, Rosa A, Ribicich M. Dpto. Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Noviembre de 2018. Río Cuarto, Córdoba. 978-987-688-333-7.

IV Encuentro de Docentes de Parasitología en Ciencias Veterinarias. **Incorporación de una plataforma virtual como complemento de la enseñanza docente de parasitología y enfermedades parasitarias.** Fariña F, Pasqualetti M, Ercole M, Bessi C, Rosa A, Ribicich, MM. Dpto. Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Noviembre de 2018. Río Cuarto, Córdoba. 978-987-688-333-7.

XIV Congreso de Producción Porcina, IX Congreso de Producción Porcina del Mercosur, XX Jornadas de Actualización Porcina, **“Evaluación de la ganancia de peso en jabalíes (*Sus scrofa*) con Trichinellosis, criados en confinamiento total”** Acerbo, M, Miguez, M, Ercole, M, Bessi, C, Pillado, S, Montalvo, F, Ribicich, MM. Córdoba, 28 al 30 de agosto, 2018.

VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Caracterización de la infección por especies silvestres de *Trichinella* en jabalíes (*Sus scrofa*)**”. Bessi, C., Pasqualetti, M.I., Ercole., M., Fariña, F., Ribicich, M.M. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, 8 de junio de 2018. Resolución (CD) N° 3434/17.

VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Estudio de la infección experimental por *Trichinella* spp. en jabalíes (*Sus scrofa*)**”. Montalvo, F; Pasqualetti, M; Fariña; Ercole, M; Bessi, C; Pillado, S; Bonboni, A; Ribicich, MM. Facultad de Ciencias Veterinarias – UBA, Buenos Aires, junio, 2018. Resolución (CD) N° 3434/17.

II Congreso Internacional de Zoonosis, IX Congreso Argentino de Zoonosis. “**Calidad en el diagnóstico de trichinellosis porcina: diseño de muestras para paneles de proficiencia. Quality assurance system for *trichinella* diagnosis in pigs: sample design for proficiency panels**” Pasqualetti, M, Bessi, C, Ercole, M, Fariña, F, Ribicich, M. Buenos Aires, 5 al 7 de junio, 2018.

II Congreso Internacional de Zoonosis, IX Congreso Argentino de Zoonosis. “**Aspectos clínicos y recuento de eosinófilos en jabalíes (*Sus scrofa*) infectados experimentalmente con tres especies de *Trichinella*. Clinical aspects and eosinophils count in wild boars (*Sus scrofa*) experimentally infected with three *Trichinella* species.**” Fariña Fernando Adrián, Pasqualetti Mariana Inés, Acerbo Marcelo, Ercole Mariano, Bessi Clara, Aronowicz Tatiana, Ribicich Miriam Mabel. Buenos Aires, 5 al 7 de junio, 2018.

VII Jornadas de Jóvenes Investigadores, “**Diseño de muestras para su implementación en paneles de pro-eficiencia para el diagnóstico de Trichinellosis porcina**”. Bessi C, Fariña F, Ribicich M, Pasqualetti M. Junio, 2017.

Helminthological Days 2017. “**Soil transmitted helminth zoonoses in squares from Buenos Aires City, Argentina**”. Cardillo, N; Loiza, Y; Betti, A; Boboni, A. Bessi, C.; Fariña, F.; Pasqualetti, M.; Martínez, G. Montalvo, F.; Vera, V.; Ribicich, M. Duchonka, Slovakia, 8 – 12 de mayo, 2017.

Premios y distinciones

Student Research Award, for the best student research paper". 15th International Conference on Trichinellosis. Cluj-Napoca, Rumania, Agosto 2019. Bessi C y col. **"Experimental study in wild boars infected with *Trichinella patagoniensis*, *T. pseudospiralis* and *T. spiralis*".**

Trabajo premiado en tema Salud animal, en la modalidad de Póster. **"Evaluación de la irradiación sobre larvas musculares de *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* en músculo de jabalíes."** Ercole M.; Bessi C. En las XXVII Jornadas de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades Grupo Montevideo - AUGM. Del 23 al 25 de octubre del 2019. En Universidade Federal de Sao Carlos - UFSCar, Brasil.

Asistencia a eventos científicos (Jornadas, Congresos, Conferencias, etc.)

Asistencia a las XII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2023.

Asistencia a las XI Jornadas de Jóvenes Investigadores. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2022.

Asistencia a las X Jornadas de Jóvenes Investigadores. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2021.

"Jornadas UBATIC+ II". V Encuentro Anual Internacional de la Red de la Universidad del Futuro y el II Encuentro Virtual sobre Tecnologías y Educación en el Nivel Superior: Prácticas creativas en escenarios extraordinarios, realizadas del 3 al 6 de noviembre de 2020.

"Jornadas de Actualización en Inmunoparasitología Diagnóstica de Protozoos Apicomplexas" Organizadas por el Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata el 18 de septiembre de 2019.

Asistencia a la 15 Conferencia Internacional de Trichinellosis. Cluj-Napoca, Rumania. Agosto, 2019.

Asistencia a la Actualización Profesional 2019, “Enfermedades Parasitarias en Caninos y Felinos”. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2019.

Asistencia a las IX Jornadas de Jóvenes Investigadores. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2019.

Asistencia al V Jornadas Interdisciplinarias, Ciclo del Agua en Agroecosistemas. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. 14, 15 y 16 de noviembre, 2018.

Asistencia a las VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Organizada por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias. Junio, 2018.

Asistencia al II Congreso Internacional de Zoonosis, IX Congreso Argentino de Zoonosis, 2018. Organizado por la Asociación Argentina de Zoonosis, Buenos Aires, 5 al 7 de junio, 2018.

Estancias y pasantías en Argentina y en el exterior

“Capacitación en la detección molecular mediante PCR en tiempo real de la infección por *Trichinella* spp. en sueros de *Sus scrofa*”. En el Servicio de Parasitología del INEI ANLIS. Tutor: Dr. Silvio Krivokapich. Desarrollado desde octubre a diciembre e 2022.

“Introdução às técnicas de RNAi e CRISPR”. Entrenamiento en biología molecular de helmintos, en el laboratorio de Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Federal de Paraná, Estado de Paraná, Brasil. Tutor: Prof. Dr Marcelo Beltrão Molento. Programa de Movilidad Académica Regional, Movilidad docente. Desde el 18 de febrero hasta el 5 de marzo de 2019.

Extensión

Servicio a terceros. Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias FCV-UBA

Programa de subsidios de extensión universitaria UBANEX - 12ª convocatoria. “Entre todos prevenimos la trichinellosis” Julio 2021- Julio 2022. Directora: Pasqualetti Mariana I.; Co-director: Fariña Fernando A.

Las buenas prácticas de producción porcina y alimentos seguros en contextos reales
IV. Facultad De Ciencias Veterinarias; Universidad De Buenos Aires, 2022.

XVI Semana Nacional de la Ciencia y Tecnología. Ministerio de Educación, Cultura,
Ciencia y Tecnología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos
Aires. Septiembre, 2018.

UBANEX 2017 de FCV. UBA. En el marco de escuelas agropecuarias y productores
porcinos. Las buenas prácticas de educación porcina y alimentos seguros en
contextos reales: promoviendo la salud de la comunidad junto a los productores,
alumnos de nivel medio, universitario y docentes. Res. (CS 6924).

Integrantes de proyecto

Estudios inmunológicos, moleculares, de susceptibilidad y comportamiento en
potenciales especies hospedadoras del género *Trichinella*. Universidad de Buenos Aires
Secretaría de Ciencia y Técnica. Programación Científica 2018. Resolución (CS) No
1041/18. Proyecto Modalidad I. Director: RIBICICH, Miriam Mabel. Codirector: ROSA,
Adriana Beatriz. Unidad Académica: Facultad de Ciencias Veterinarias. Acreditado y
financiado. Código 20020170100530BA Función: Becario Grado de avance: 75%.

Optimización del sistema de detección de *Trichinella* spp. en laboratorios de diagnóstico.
Universidad de Buenos Aires Secretaría de Ciencia y Técnica. Directora: Pasqualetti,
Mariana Inés. Unidad Académica: Facultad de Ciencias Veterinarias. Código:
20020190200396BA. Función: Becario. Vigente. Grado de avance: 75%.

Laboratorios híbridos de enseñanza veterinaria. Proyecto UBATIC. Universidad de
Buenos Aires. Convocatoria 2021-2022. Directora: Mariana Vaccaro.

Evaluación de métodos de inactivación de larvas de *Trichinella* spp en tejidos animales
y escenarios de dispersión del parásito en regiones no evaluadas. Agencia Nacional de
Promoción Científica y Tecnológica. Fondo Para la Investigación Científica y
Tecnológica (FONCyT). Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) 2018.
Director: Ribicich, Mabel. Acreditado y financiado. Código PICT-2018- 01203. Función:
Becario. Vigente, grado de avance: 75%.

Utilización de los paneles de pro-eficiencia para la valoración del diagnóstico de
trichinellosis en cerdos domésticos y silvestres. Universidad de Buenos Aires. Directora:

Pasqualetti, Mariana Inés. Unidad Académica: Facultad de Ciencias Veterinarias. Código: 20020170200331BA. Becario. Grado de avance: 75%.

Trichinellosis en jabalíes. Estudio de la infectividad y el diagnóstico de las especies de *Trichinella* encapsuladas y no encapsuladas. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Fondo Para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT). Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) 2015. Director: Ribicich, Mabel. Acreditado y financiado. Código PICT-2015- 2350. Función: Becario. Grado de avance: finalizado.

Los paneles de pro-eficiencia como herramienta para la acreditación de laboratorios de diagnóstico de trichinellosis en animales. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. Fondo Para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT). Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT) 2015. Director: Pasqualetti, Mariana Inés. Acreditado y financiado. Código PICT-2015- 3469. Función: Becario. Grado de avance: finalizado.

Membresías en sociedades científicas

Miembro de la International Commission on Trichinellosis (ICT). Septiembre de 2019. La International Commission on Trichinellosis (ICT) es una organización internacional de científicos interesados en distintos aspectos de *Trichinella* o de la Trichinellosis. A su vez, la ICT es miembro de la World Federation of Parasitologists, por medio de la cual se encuentra afiliada a la International Union of Biological Sciences. En este trabajo, ICT coopera con organizaciones nacionales e internacionales (por ejemplo, WHO, OIE, FAO, etc.) quienes están interesadas en el control de *Trichinella*. Website: <http://www.trichinellosis.org/>