

R-2665

T. 73

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

SEROLOGIA Y SERODIAGNOSTICO DE LA

TRIQUINELLOSIS HUMANA

MEMORIA, QUE PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
FARMACIA, PRESENTA:

Rosario Gutiérrez Ramos

Rosario Gutiérrez

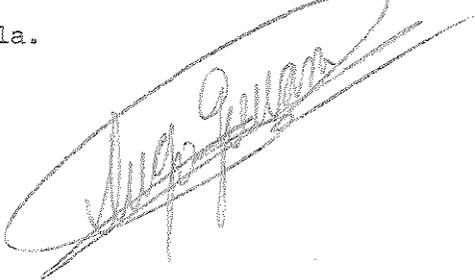
Esta TESINA ha sido realizada en los Laboratorios del Departamento de Parasitología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

En Sevilla, a 4 de Julio de 1986

Los directores

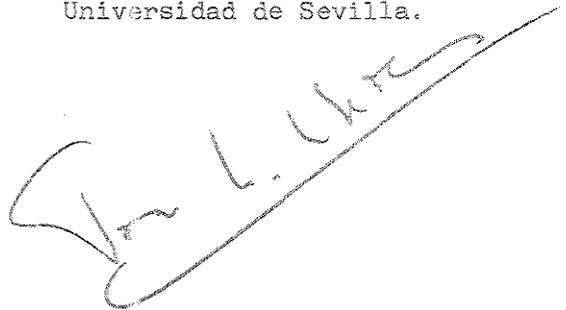
Fdo: Prof. Dr. D.

Diego Carlos Guevara Benítez
Profesor Catedrático del Dpto.
de Parasitología de la Facultad
de Farmacia de la Universidad de
Sevilla.



Fdo: Prof. Dr. D.

Jose Manuel Ubeda Ontiveros
Profesor titular del Dpto.
de Parasitología de la Fa-
cultad de Farmacia de la
Universidad de Sevilla.



JOSE MANUEL UBEDA ONTIVEROS; Director del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla, certifica que la realización de la Tesina "Serología y Serodiagnóstico de la Trichinellosis Humana" de Dña. Rosario Gutiérrez Ramos, se ha llevado a cabo en los Laboratorios de dicho departamento.

A handwritten signature in dark ink, slanted downwards from left to right. The signature is cursive and appears to read 'Jose M. Ubeda Ontiveros'. The signature is written over a thin horizontal line that extends across the width of the signature.

Mi más sincero agradecimiento:

Al profesor Dr. Guevara Benítez, por permitirme la realización de esta tesina , aceptando la dirección de la misma, ayudandome en todo momento.

Al Profesor Dr. Ubeda Ontiveros sin cuya continua ayuda no hubiese sido posible la realización de esta tesina.

A la Profesora Dr. Cristina Cutillas Barrios por la colaboración prestada.

A la Profesora Dña. Ariza Astolfi, por sus palabras de aliento y estímulo.

A la Licenciada Dña. Rodriguez Baza, por su ayuda y comprensión.

A la licenciada Dña. Ballester Alfaro, por su amistad y ayuda.

INDICE

pag.

I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ANTECEDENTES.....	20
II.1.- Intradermorracción.....	22
II.2.- Inmunocitoadherencia.....	23
II.3.- Hemaglutinación Indirecta.....	24
II.4.- Fijación del Complemento.....	26
II.5.- Bentonita.....	26
II.6.- Látex.....	27
II.7.- Prueba de Suessenguth y Kline.....	27
II.8.- Microprecipitación.....	29
II.9.- Inmunolectroforesis.....	29
II.10.- Inmunofluorescencia.....	30
II.10.1.- Inmunofluorescencia Directa.....	30
II.10.2.- Inmunofluorescencia Indirecta.....	31
II.11.- ELISA.....	34
III.- JUSTIFICACION.....	36
IV.- MATERIAL Y METODOS.....	39
IV.1.- MATERIAL.....	40
IV.1.1.- Los Parásitos.....	40
IV.1.1.a.- <u>T.spiralis</u>	40
IV.1.1.b.- <u>A.suum</u>	40
IV.1.1.c.- <u>F.hepatica</u>	41
IV.1.2.- Animales de experimentación.....	41
IV.1.3.- Reactivos.....	41
IV.1.3.a.- Inmunisueros.....	41
IV.1.3.b.- Conjugados fluorescentes.....	42
IV.1.4. Microscopio.....	42

IV.2.- METODOS.....	43
IV.2.1.- Infestación experimental de animales con <u>T.spiralis</u>	43
IV.2.2. Obtención y Purificación de larvas de <u>T.spiralis</u> ..	44
IV.2.2.1. Obtención de las larvas de <u>T.spiralis</u>	44
IV.2.2.2. Purificación de las larvas de <u>T.spiralis</u>	44
IV.2.3. Preparación de extractos antigénicos.....	51
IV.2.3.1. Extractos totales de <u>T.spiralis</u>	51
IV.2.3.2. Extractos totales de <u>F.hepatica</u> y <u>A.suum</u>	52
IV.2.4. Obtención de inmunisueros.....	55
IV.2.5. Test de IFI para triquinelosis humana.....	56
IV.2.6. Valoración del test de IFI.....	59
IV.2.7. Encuesta seroepidemiologica.....	61
V.- RESULTADOS Y DISCUSION.....	64
V.1 Sobre influencia de las diferentes técnicas de di- gestión ensayadas.....	64
V.2. Sobre la influencia de la concentración de antígeno en los títulos de anticuerpos obtenidos en el test IFI para triquinelosis.....	66
V.3. Influencia del tratamiento del antígeno sobre los resultados obtenidos con el test de IFI para sero- diagnóstico de triquinelosis.....	69
V.4. Valoración del test de IFI para serodiagnóstico de triquinelosis: precisión, sensibilidad y especifici- dad.....	85
V.4.2. Sensibilidad.....	87
V.4.3. Especificidad.....	92
V.5. Estudio seroepidemiológico en población humana median- te el test de IFI.....	97
VI.- CONCLUSIONES.....	106
VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	109

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION

La triquinelosis, es una enfermedad parasitaria humana que se ha presentado y se sigue presentando, pese a las medidas de control puestas en juego en la mayoría de los países, en forma de brotes epidémicos de diversa importancia y extensión, casi siempre acompañados de pérdida de vidas humanas.

Tiedemann, en 1822, (27) durante la autopsia de un cadáver humano, encontró en los músculos, especialmente de las extremidades, unos corpúsculos blancos y duros cuyo análisis químico demostró la presencia de fosfato cálcico, carbonato cálcico y materia orgánica similar a albúmina o fibrina. Si bien Tiedemann no relacionó su hallazgo con ningún tipo de parásito, su similitud con posteriores casos de triquinelosis comprobada, induce a algunos autores a pensar que los corpúsculos encontrados por Tiedemann eran larvas de triquina, en cuyo caso sería ésta la primera alusión a tal parasitismo, si bien con un diagnóstico a posteriori no exento de justificadas dudas. Sin embargo, en la actualidad la fecha de 1835 es la aceptada por todos como la del descubrimiento del parásito.

Efectivamente, el día 2 de febrero de 1835 un estudiante de medicina de 21 años, llamado James Paget, observó unas pequeñas manchas en los músculos de un cadáver humano cuya disección estaba realizando en la Sala de Disección del Hospital de San Bartolomé de Londres. El día 6 del mismo mes leyó un informe en la Abernethian Society dando cuenta de su descubrimiento (27).

Pero la paternidad científica del descubrimiento de una nueva especie de parásito hay que asignarla a Owen, quien tuvo la oportunidad de estudiar el material recogido por Paget y a partir

de él, hacer la descripción y nominación de la nueva especie en un informe presentado ante la Zoological Society (27). Owen denominó al parásito Trichina spiralis, nombre que posteriormente fué cambiado por el de Trichinella spiralis al encontrarse ocupado el nombre genérico Trichina por un grupo de dípteros, la nueva y definitiva combinación se debe a Railliet en 1895 (27).

El interés despertado por los escritos de Owen fue extraordinario y a partir de entonces han sido ininidad los hallazgos denunciados en el hombre y en otros numerosos animales, dándose descripciones cada vez más completas y detalladas del parásito y completándose los conocimientos sobre su biología en el más amplio significado de la palabra. Podemos decir que son muchas decenas de miles los trabajos que sobre Trichinella y triquinelosis han sido publicados hasta la fecha en las revistas especializadas de todo el mundo.

Poco después de los descubrimientos de los autores mencionados al principio se registraron nuevos casos de triquinelosis en Europa y Norteamérica.

Von Siebold 1844 (13) y Dujardin 1845 (13) sospecharon que el parásito encontrado en tejidos musculares era la fase larvaria de un nematode.

Joseph Leidy, de Filadelfia, (13) encontró los quistes en la carne de cerdo, e hizo notar su semejanza con los hallados en el hombre.

Las investigaciones de Leuckart 1855-1860 (13), y de

Virchow 1859-1860 (13), demostraron que estos quistes se convertían en gusanos adultos en pocos días cuando se administraban a ciertos animales de experimentación, y que las hembras en las paredes del duodeno depositaban larvas vivas que emigraban a los músculos para enquistarse en ellos.

En 1860, Friedrich von Zenker (77) hizo la autopsia de una campesina de 20 años de edad que había muerto de " tifoidea atípica " y descubrió en ella las formas intestinales de Trichinella. En su estudio encontró miles de larvas enquistadas en los músculos del cadáver y concluyó que la infección había sido resultado de la ingestión de salchichas crudas.

Pasaron varios años antes de que investigadores alemanes comprobaran experimentalmente que el consumo de carne de cerdo infectada, cruda o mal cocida, es el responsable de triquinelosis en el hombre.

Durante la última parte del siglo XIX y el presente siglo la triquinelosis ha sido reconocida como un importante problema de salud pública. Siendo la enfermedad objeto de especial interés para las autoridades sanitarias, médicos y parasitólogos, particularmente en EEUU, en donde se presentaron epidemias repetidas y algunas muertes en grupos de personas que habían ingerido carne de cerdo triquinosa.

Respecto a su posición taxonómica, según la última revisión realizada por Anderson y Bain en 1982 (1), Trichinella spiralis pertenece a la clase Nematoda, subclase Adenophorea, Chitwood, 1933; orden Enoplida, Chitwood, 1933; superfamilia Tri-

chinelloidea, Hall, 1916; familia Trichinellidae, Ward, 1907; género Trichinella, (Owen, 1835) Railliet, 1895.

Dentro del género Trichinella, se admiten hoy día otras varias especies distintas (T.pseudospiralis; T.nelsoni; T.nativa), además de la primitiva y bien conocida T.spiralis.

El ciclo biológico de T.spiralis es directo (figura nº1) Los machos adultos, que miden 1,4-1,6 mm de longitud por 0,04-0,06 mm de diámetro, tienen un tamaño que es aproximadamente igual a la mitad de la hembra. El ano está situado en el extremo posterior del cuerpo. El macho carece de espículas, por lo que la cloaca es evertida durante el coito, y su abertura está flanqueada por dos pápilas. La vulva de la hembra se encuentra en la mitad anterior del cuerpo, y el sistema genital femenino es sencillo.

Los machos y hembras se encuentran en los pliegues de la mucosa intestinal del huésped, entre las vellosidades, donde se efectúa la cópula, tras la cual mueren los machos. Al principio, los gusanos adultos pueden alojarse en las criptas glandulares, pero después penetran en las vellosidades intestinales, en la estroma interglandular, en las capas profundas de la pared intestinal, y aún en los ganglios linfáticos mesentéricos. Después de la fecundación, las hembras comienzan a depositar larvas, que miden unas 100 de longitud por 6 de diámetro. La larviposición se prolonga durante 4-6 semanas o más; es decir, durante todo el tiempo que viven las hembras (Carter, 1949), (10). Durante este período, cada hembra deposita al menos 1.500 larvas, aunque no todas llegan a convertirse en organismos encapsulados, ya que algunas quizás escapen al principio a la luz intestinal y son expulsadas, pero la mayo-

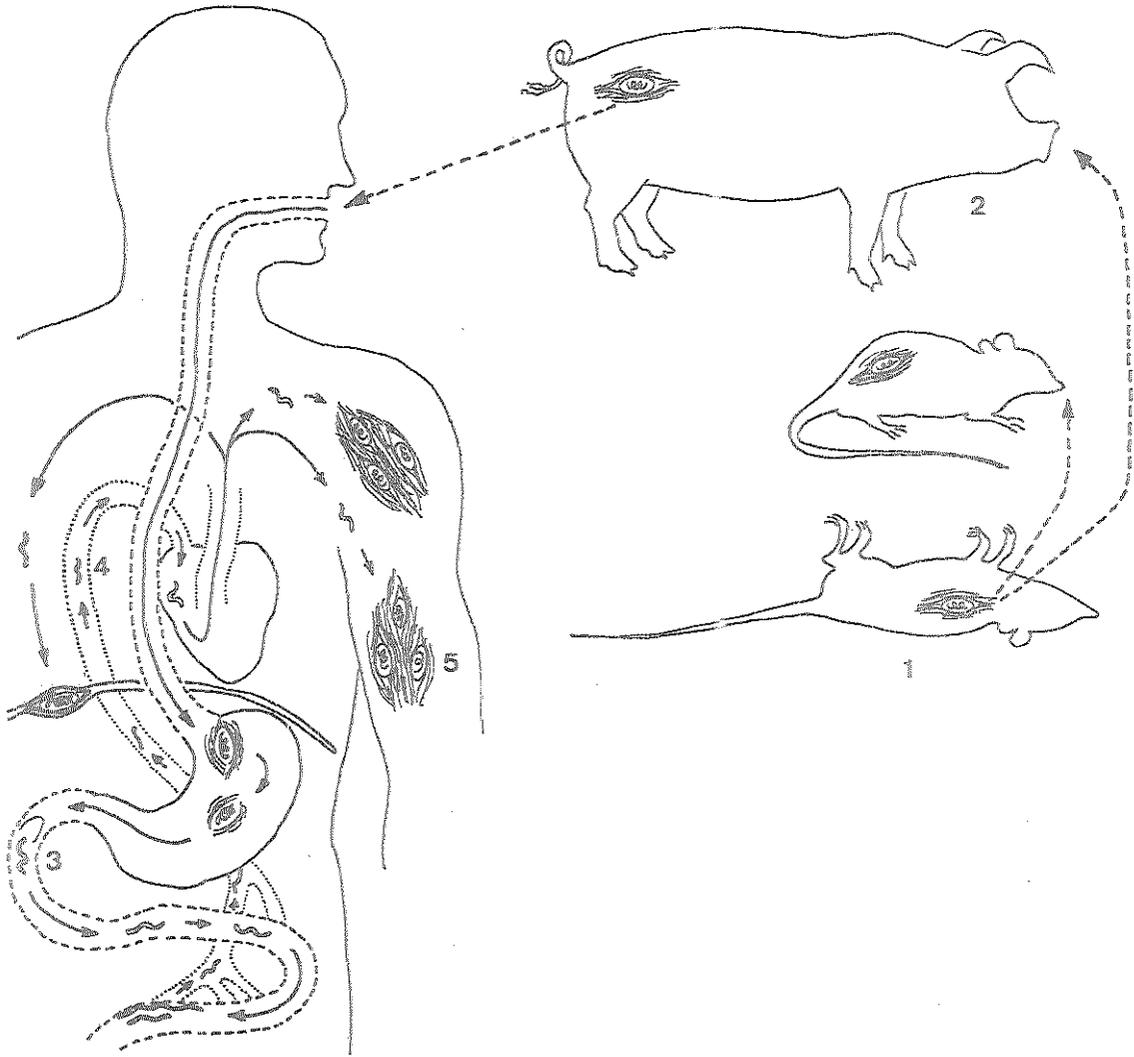


Figura nº1 Ciclo biológico de T.spiralis en el hombre.

- 1.: reservorio salvaje.
- 2.: reservorio peridoméstico.
- 3. : fase intestinal.
- 4. : larvas migratorias por la circulación sanguínea.
- 5. : larvas enquistadas en los músculos esqueléticos.

ría llegan a los linfáticos intestinales o a las vénulas mesentéricas pasando a sangre venosa, penetran en la vena porta hepática y alcanzan las cavidades derechas del corazón; desde aquí llegan a los pulmones, de nuevo al corazón y pasan después a la circulación arterial, en donde se las encuentra entre el noveno y vigesimotercer día.

Pueden alojarse en diversos tejidos, incluso el miocardio y el encéfalo, así como en el líquido cefalorraquídeo y en las cavidades corporales, desde donde vuelven a penetrar en el torrente circulatorio, y por último en los músculos estriados, donde se encuentran.

La mayor proporción de larvas se encuentran en los músculos pobres en glucógeno. Brand y col., 1952 (9) encontraron que en algunos substratos, las larvas consumen las mismas cantidades de glucógeno en aerobiosis que en anaerobiosis, y que el metabolismo de los lípidos, productor de energía para la movilidad, sólo se realiza en presencia de oxígeno libre.

Goldberg 1958, (19) determinó que las larvas utilizan el patrón Embder-Mayerkoff de glicólisis fosforativa, e identificó los diferentes enzimas.

Como mencionamos anteriormente, las larvas se encapsulan en los músculos esqueléticos. La cápsula es una vaina elipsoidal adventicia de extremos romos, resultante de la infiltración de células redondas y eosinófilos alrededor de la larva estrechamente enrollada. El eje longitudinal del quiste es paralelo al de las fibras musculares. Los músculos que se encuentran más parasitados son: diafragma, laringe, lengua, intercostales, ab-

dominales, bíceps, psoas, pectorales, gemelos, deltoides y otros que están en constante actividad.

Kershaw y col., 1956 (33) estudiaron un brote de triquinelosis que se presentó en Liverpool y en el cual hubo 82 supuestos casos, con dos muertes; uno, por una complicación cardíaca y el otro, por embolia pulmonar. En el primer cadáver encontraron 132 larvas por gramo en la lengua, 35 en el deltoides derecho y 82 en el izquierdo, 54 en el pectoral derecho y 23 en el izquierdo y 107 en el diafragma. El segundo cadáver estaba menos infectado.

Nelson, 1961, (50) examinó el cadáver de un niño muerto en Kenya, oscilando el número de larvas por gramo entre las 5.190 en los músculos de la lengua y las 1.850 en los sacroespi-
nales, pasando de las 2.095 en diafragma.

Un estudio sobre la localización de las larvas de T. spiralis (Owen 1835), Railliet, 1895, en los músculos del cerdo fue realizado por Lizcaño Herrera, 1979, (41) siendo el resultado en porcentajes el reflejado en la página siguiente (Fig.2).

Una vez formado el "quiste", la larva crece dentro de la cápsula hasta alcanzar de 0,8 a 1 mm de longitud, lo que origina degeneración o tumefacción de las fibras musculares adyacentes, engrosamiento y alteraciones del sarcolema, con hipertrofia e hiperplasia, fragmentación de las fibras y depósito de la membrana capsular interna, seguido de la formación, a partir del endomisio, de una cápsula fibrosa externa que contiene gran número de capilares sanguíneos. Toda la pared quística resulta de la reacción hística del huésped, sin intervención activa de la larva.

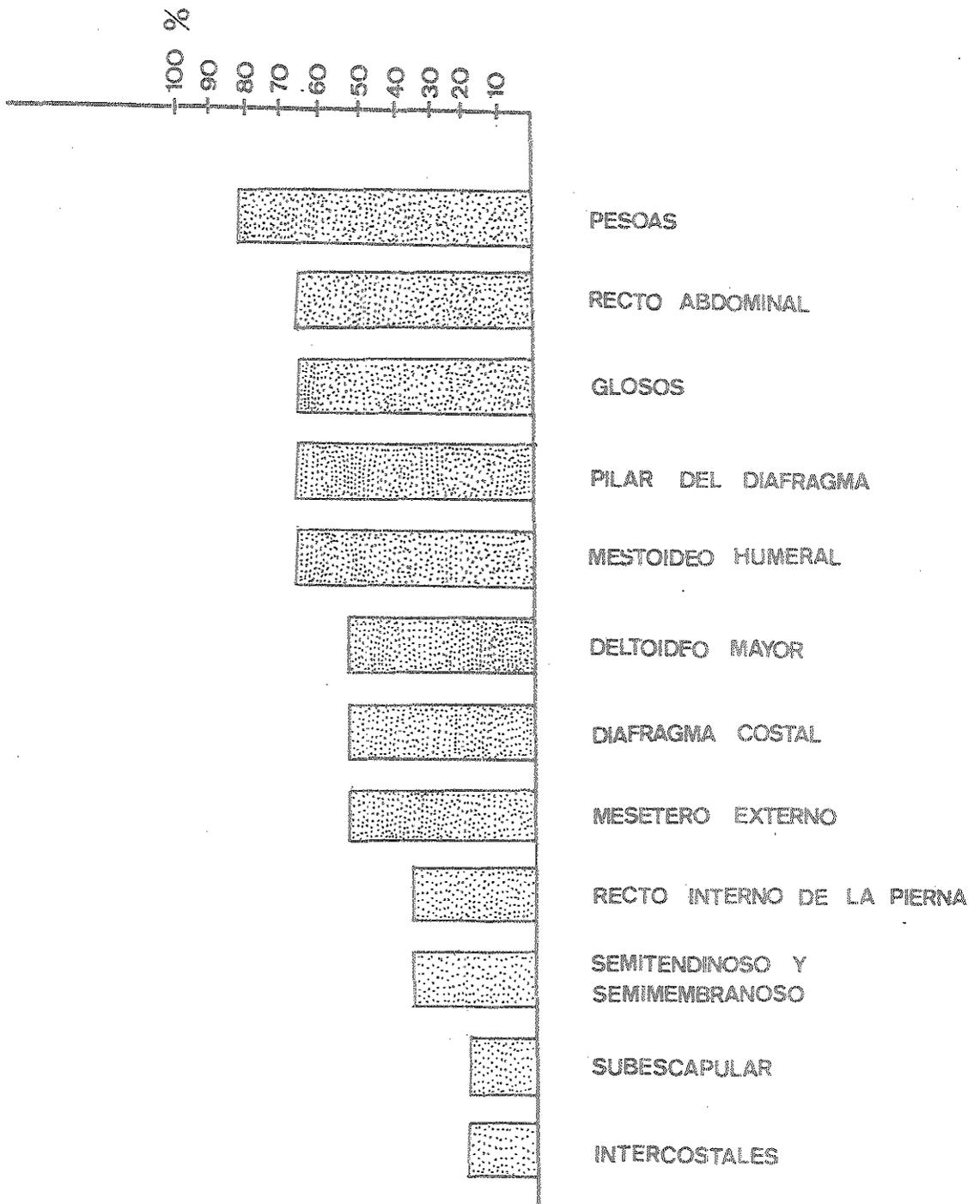


Figura nº 2: Distribución en % de larvas de *T. spiralis* enquistadas en músculos de cerdos experimentalmente infectados. (Lizcano Herrera, 1979)

La pared del "quiste" es lo suficientemente permeable para permitir el paso de aminoácidos hacia dentro, de tal manera que puedan ser convertidos en proteínas por la larva. Las larvas enquistadas pueden permanecer viables durante muchos años, aunque generalmente se calcifican entre los 6 y los 9 meses. Cinco larvas por gramo de peso corporal en el hombre pueden producir la muerte, si bien se sabe de individuos muertos por otras causas que tenían hasta mil larvas por gramo. En los cerdos, 10 larvas por gramo pueden causar la muerte, y en la rata 30 por gramo.

Cuando se ingiere carne que contiene quistes viables, las larvas se desprenden de la pared quística en el duodeno y penetran rápidamente en su mucosa. La magnitud del traumatismo y la intensidad de la reacción inflamatoria del epitelio afectado dependen del número de organismos invasores. Los gusanos maduran en cinco a siete días, copulan y las hembras comienzan a descargar larvas en los tejidos. En todos los músculos que atraviesan, y en cualquiera en que se alojan, las larvas originan una reacción inflamatoria local aguda, la cual tiende a remitir cuando se enquistan, pero la toxemia se hace notoria. Mientras tanto, las larvas que pasan por el miocardio provocan infiltración celular en su trayecto, con la consiguiente necrosis y fibrosis de los haces del miocardio.

La sintomatología se divide en tres periodos sucesivos: 1, invasión; 2, migración de las larvas; 3, enquistamiento y reparación de los tejidos.

Durante el período de incubación que dura cinco días, hay irritación e inflamación del epitelio duodenal en todos los sitios donde las larvas penetran la pared intestinal, con vómitos,

náuseas, diarrea, cólicos y sudores profusos, cuadro que se asemeja al de la intoxicación alimentaria aguda. Estos síntomas se inician a veces a las 24 horas, o menos, del contagio y pueden continuar durante el segundo período. En algunos casos aparecen máculas de color escarlata brillante o un exantema máculo papular en la piel del tronco y extremidades. Los síntomas respiratorios que comienzan entre el 2 y 6 día y que duran unos cinco días, se observan en el 30 % de los pacientes en los que la triquinelosis produce síntomas clínicos.

Durante el período de puesta y migración larvaria y, en consecuencia de infiltración muscular, hay mialgias, signo del proceso inflamatorio que se desarrolla en esas estructuras. Con frecuencia aparecen dificultades en la respiración, masticación y deglución, así como en el habla y, a veces, se observa parálisis espásticas de los músculos, sobre todo en las extremidades. El edema, que en algunos casos precede a este período y por lo general es una de sus manifestaciones, se observa especialmente alrededor de los ojos, mejillas, sienes y en las manos, y es producido por la migración de las larvas a través de los vasos sanguíneos de esas regiones y por la consiguiente inflamación perivascular y endovascular que provocan.

Es típica la fiebre remitente, que se eleva hasta 40 o 41°C y la eosinofilia elevada (10-17 % o más), con leucocitosis; sin embargo, en los casos graves, la eosinofilia puede ser insignificante. En algunos pacientes se encuentra hiperplasia de la médula ósea y aumento de los mieloblastos. El daño al corazón constituye una de las complicaciones más graves y bastante común en la triquinelosis. En algunos casos se ha observado tromboflebitis y trombosis entéricas, y a veces se ha presentado encefalitis,

meningitis, trastornos oculares, diplejía, sordera y el síndrome de esclerosis lateral amiotrófica. En la mitad de los casos hay quemosis y coloración amarillo limón de la conjuntiva.

El período de enquistamiento, junto con las secuelas, constituye la 3ª etapa de la enfermedad, la más crítica. Puede haber caquexia, edema tóxico o deshidratación extrema. En casos graves, el pulso es al principio acelerado y fuerte, después se debilita rápidamente y aparece cianosis. La tensión sanguínea desciende en poco tiempo y el paciente entra en colapso. Entre los trastornos nerviosos se encuentran neuritis periférica, alteraciones visuales, disminución y pérdida de los reflejos, desorientación, alucinaciones, delirio y encefalitis.

Spink, 1935, (10) publicó un caso de hemiplegia derecha permanente, y Dandy, 1945, (13) otro de epilepsia jacksoniana, secuela de triquinelosis activa padecida 10 años antes. El paciente puede sucumbir por toxemia, miocarditis, iniciada por las larvas migratorias o a consecuencia de las complicaciones como neumonia, peritonitis, pleuresia y nefritis.

Si bien los síntomas que acabamos de enumerar son característicos de la triquinelosis clínica, el comienzo y el curso de la infección son a veces lo bastante atípicos para que exista la posibilidad de establecer un diagnóstico erróneo, casi en la totalidad de los casos leves el cuadro carece de especificidad.

T. spiralis tiene una distribución cosmopolita. En la naturaleza la infección es mantenida comúnmente entre la rata negra y la gris, que son caníbales. A veces hasta el 75 % de las ratas examinadas se han encontrado infectadas. Se han encontrado también gatos,

perros, osos, jabalíes. En aves la parasitación es del 4-6 % dentro de su reino y del 0,15 % sobre el total.

Witemberg, 1964, (79) obtuvo una amplia información en relación a la triquinelosis de los animales salvajes y domésticos. Dicho autor comunicó infecciones graves en gatos de Polonia, Rusia Central, Noruega, México y EEUU, y en perros de Polonia, Rumania, Bielorrusia, Manchuria, Noruega, EEUU.

Hunt, 1967, (29) examinó entre febrero de 1965 y febrero de 1966, los diafragmas de 155 perros y de 55 gatos del centro de Nueva Jersey para buscar infección por T.spiralis, y encontró el 2,6 y el 3,2 % respectivamente, de animales afectados.

Lukashenko y Brzesky, 1962, (43) registraron los siguientes animales del Artico infectados: walrus, foca de anillo, oso polar, oso pardo, zorro polar, armiño, marta, zorra, lobo, glotón americano, tejón, zorro plateado, erizo, mapache, mofeta y muchas otras especies de roedores pequeños.

En Alaska, Rausch, 1953, (55) encontró triquinelosis en osos, perros, lobos, zorros, glotón americano, ardilla, ballena blanca y foca, y concluye que el oso polar es probablemente la fuente de infección humana.

Maynard y Pauls, 1962, (48) en el informe de dos brotes epidémicos en Alaska, atribuyen la infección al consumo de carne de osos negros.

Roselle y col., 1965, (61) registraron seis casos humanos en Nueva Inglaterra resultado del consumo de carne de un oso matado

en Vermont.

Kozar, 1959, (34) en Polonia, atribuye la alta frecuencia de triquinelosis en la población humana, 38 %, y los brotes epidémicos observados, al consumo de salchichas elaboradas con carne de cerdos que habían sido alimentados con carne y vísceras de animales silvestres (zorros, tejones, martas, mofetas y jabalíes salvajes).

Forrester y col., 1961, (17) comunicaron el primer brote auténtico de triquinelosis en Africa, al sur del Sahara, en nativos de una tribu de Kenya, resultado de la ingestión de carne de jabalíes salvajes.

El hombre adquiere la infección normalmente al ingerir carne de cerdo parasitado, poco cocida o preparada defectuosamente, y, a veces, de forma incidental, con carne de oso u otros animales salvajes. La salchicha de tipo rural y algunas de tipo europeo, son la causa más frecuente de la triquinelosis con manifestaciones clínicas. Si la carne de un cerdo infectado se mezcla con la de muchos que no lo están, la dosis por Kg de carne disminuye y se produce triquinelosis leve o asintomática.

Bourns, 1952, (6) halló después de realizada la autopsia, larvas de T.spiralis en el diafragma de un niño de 6 semanas (22 quistes por gramo de músculo), en Columbia Británica.

En las condiciones creadas por el hombre para la reproducción y engorde de los cerdos, probablemente sean los residuos no esterilizados de estos mismos animales o los despojos de otros salvajes infectados, la fuente de infección de triquinelosis más común

en los cerdos de los EEUU en nuestros días, (13).

Otra posible fuente de exposición muy frecuente para los cerdos consiste en la ingestión de las heces de carnívoros infectados, tales como ratas, ratones, zorros o incluso de otros cerdos, en el período en que las larvas enquistadas y maduras se están estableciendo en la pared intestinal de estos animales (Olsen y Robinson, 1958, Zimmerman y col., 1968), (52), (82).

Aunque la triquinelosis es de distribución cosmopolita, es en Europa y en EEUU donde la incidencia es más alta. En EEUU, durante 1954 y 1955, se registraron casos de pequeñas o grandes epidemias en Pensilvania, Ohio, Indiana, Nueva York, Wincosin, Iowa y Utah, mientras que en 1958 se registraron 7 brotes. El total de brotes en 1956 y 1957 fue de 11, (13).

Dentro del continente europeo, Rumania, Hungría, Bulgaria, oeste de Rusia y sobre todo Polonia, son los países donde se registran más brotes epidémicos. En este último país y durante el período comprendido entre 1945-1957 fueron registrados 5.237 casos de triquinelosis humana, falleciendo el 2,13 % (Kozar, 1959) (34).

Zolnierkowa, 1959, (83) recoge una epidemia ocurrida en un distrito de Polonia en 1959 en el que estuvieron implicadas 378 personas. En 1960 ocurrieron otras dos epidemias, la primera de ellas en Poznan, con 1.122 casos y 2 muertos (Kozar, 1961) (35), la otra en Zalrze, con 572 personas afectadas (Gancarz y Kepska, 1962) (18).

En 1953 se produjo en Liverpool, Inglaterra, una epidemia de triquinelosis con 53 casos diagnosticados y un fallecimiento. La mayoría de los pacientes habían comido salchicha infectada, pero al-

gunos se contagiaron al manipular la salchicha cruda, (13).

Entre enero y mediados de mayo de 1947 se registró en Groenlandia una epidemia de triquinelosis con 300 casos y 33 muertos. La infección fue de comienzo súbito en unos pacientes y gradual en otros. El origen de la epidemia se halló en el consumo de carne de morsa, (13).

En Yugoslavia, Milanovic y col., 1964, (49) señalan 240 casos con varias muertes. La fuente de la infectación en todos los casos fue la ingestión de carne de cerdo.

Durante el período de 1963-1968 se registraron en Rumania 71 brotes epidémicos, (13). Cironeau en 1971, (11) notifica 12 casos en este mismo país.

En el norte de Baviera, en diciembre de 1976, tuvo lugar una epidemia en la que se infestaron 73 personas al consumir embutidos procedentes de carne de jabalí, (13).

En 1977, en Alemania se resgistró un brote con 58 personas afectadas. La fuente de infestación fue la ingestión de carne, poco cocinada, procedente de jabalí (Stumpf y col., 1981) (71).

La primera epidemia humana ocurrida en Japón, notificada oficialmente fue en 1974 en la prefectura de Aomori, en la parte norte del país (Yamaguchi, 1978) (80).

En México, Martínez Marañón y col., 1974, (45) en los años 1972-1973 encontraron mediante triquinoscopía, 42 casos positivos, entre 1000 diafragmas examinados, 37 de estos tenían menos de 10 larvas por gramo, y en 36 las larvas estaban calcificadas.

En EEUU, donde se realizan exámenes post-mortem muy frecuentes, se ha comprobado que en 1974 se produjeron 16.000 casos nuevos de triquinelosis en comparación con los 200-300 casos denunciados anualmente en fechas anteriores.

Actualmente la triquinelosis en España es un parasitismo que sigue siendo todavía problema sanitario, si bien restringido, a pesar de las medidas preventivas que se practican con marcada eficiencia. El sacrificio clandestino de cerdos destinados al suministro cárnico, principalmente en forma de embutidos que no son sometidos a la esterilización culinaria o técnica, y el consumo de carne de jabalíes que han soslayado el obligatorio examen sanitario, son las principales causas de los brotes esporádicos que se presentan en nuestro país. El primer brote epidémico registrado tuvo lugar en Villar del Arzobispo, Valencia, Rodríguez de Cepeda, 1878, (56), con 25 personas afectadas y 5 muertes. Desde entonces, cada año son notificados brotes epidémicos ocurriendo estos en todos los lugares del país.

En 1900 ocurrieron en Murcia dos epidemias, que afectaron a 227 personas, de las cuales fallecieron 11, (27).

La provincia más afectada es la de Cáceres, en la cual entre 1944 y 1960 ocurrieron 13 brotes epidémicos y 12 muertes, (Herrero y Martín, 1961) (28).

En 1952, Durich, (16) señala 3 epidemias en la provincia de Valencia desde 1945 a 1950.

En 1972, Rodríguez Osorio y col., (57) diagnosticaron 27 casos de triquinelosis de entre los ocurridos en una epidemia en el Carpio, Córdoba y 19 procedentes de otra epidemia ocurrida en

Almaden, Ciudad Real.

Rodríguez Osorio y col., 1974, (58) realizaron un estudio seroepidemiológico sobre 499 sueros encontrando que un 0,6 % de la población de Granada poseían anticuerpos frente a T.spiralis.

En Barcelona, Gudiol y col., 1974, (26) notificaron un brote epidémico agudo.

En 1976 hubo dos brotes epidémicos en España (notificados por la Subdirección General de Medicina Preventiva y Sanidad Animal), uno en Santa Amalia (Badajoz) que afectó a 17 personas y el otro en las localidades de Castrillón, Pravia, Salas y Cornallana (Asturias). En el primero el vehículo de infestación fue embutido fabricado con carne de jabalí y el segundo, carne de cerdo procedente de un mata-dero clandestino.

En Córdoba, Martínez y col., 1978, (46) examinaron por la prueba del látex un total de 315 sueros humanos, encontrando un 1,2 % de positividades.

Durante el mes de diciembre de 1979, en la provincia de Soria hubo un brote de triquinelosis originada por la ingestión de carne de jabalí (Perales Agueda, 1982) (54).

Entre 1980-1983, la Dirección General de Salud Pública, a través de su boletín epidemiológico semanal, denuncia 636 casos, 7 en Avila en 1980; 90 en Badajoz en 1982, 4 en 1983; 2 en Baleares en 1982, 1 en 1983; 11 en Cádiz en 1983; 6 en Cantabria en 1982; 6 en Ciudad Real en 1982, 1 en 1983; 30 en Huelva en 1982; 10 en Huesca en 1981; 14 en Madrid en 1981, 10 en 1982; 164 en Sevilla en 1982, 167 en 1983.

Cuando la triquinelosis ocurre en brotes epidémicos no pasa desapercibida al clínico, pero si tiene lugar en casos aislados, es fácilmente confundible con otras afecciones. En consecuencia, los casos nuevos denunciados nunca concuerdan con los casos reales.

II.- ANTECEDENTES
= = = = =

II.- ANTECEDENTES

Ya que los síntomas clínicos de la triquinelosis son comunes a muchas otras afecciones es necesario establecer, en los casos sospechosos, un diagnóstico de laboratorio que despeje las dudas respecto al agente etiológico involucrado, aun mas si se tiene en cuenta la cantidad de procesos de triquinelosis subclínica que existen y para los que al ser asintomáticos, la única posibilidad de diagnóstico reside en pruebas de laboratorio adecuadas.

En la fase inicial de la enfermedad y cuando la infestación es masiva, existe la posibilidad de encontrar larvas del parásito en heces, lo que permitiría establecer un diagnóstico por técnicas parasitológicas basadas en la visualización al microscopio de dichas larvas en muestras fecales.

En la fase de migración larvaria también pueden encontrarse larvas en sangre circulante, lo que también permitiría un diagnóstico parasitológico a partir de una muestra de sangre.

Sin embargo, la presencia de las larvas en sangre o heces es fugaz y su hallazgo ocasional y supeditado a la sospecha clínica precoz de triquinelosis, por lo que el valor de las técnicas parasitológicas en el diagnóstico de laboratorio del parasitismo humano es muy limitado. Lo que podría aplicarse a las biopsias musculares durante la fase de enquistamiento del parásito.

En conclusión, desde un punto de vista práctico las únicas técnicas de laboratorio aplicables al diagnóstico de la triquinelosis humana son las serológicas.

A lo largo del tiempo, son muchos los tests serológicos que se han ensayado a fin de aplicarlos al serodiagnóstico del pa-

rasitismo humano por T.spiralis pudiéndose decir que no existe test inmunológico que no se intentase adaptar, con más o menos éxito, a este propósito.

II.1.- INTRADERMORREACCION

Bachman, 1928, (3) empleó antígeno de triquina en diluciones de 1 por 5.000 y 1 por 10.000 inyectado subcutáneamente a pacientes sospechosos de triquinelosis. En las reacciones positivas, independientemente de la intensidad de la parasitosis, apareció una pequeña tumefacción blanca alrededor del lugar de la inyección, rodeada de una zona eritematosa de contorno irregular y de unos 5 cm de diámetro. La lectura la realizó a los 15-20 minutos. No fue muy segura, ya que presentó reacciones de precipitación falsamente positivas.

En 1953, Luengo Miro, (42) publicó un trabajo en el que se proponía estudiar los posibles casos humanos de triquinelosis subclínica que pudieran existir en Madrid. Mediante infestaciones experimentales consiguió larvas de T.spiralis para preparación de los antígenos a emplear en los tests ensayados: intradermorreacción y cutirreacción. Las larvas de triquina las consiguió de ratas experimentalmente infestadas con carne triquinosa de cerdo con infestación espontánea. Por digestión péptica liberó dichas larvas y con ellas preparó el antígeno. Los resultados negativos que obtuvo en ratas blancas experimentalmente infestadas tanto en la intradermorreacción como en la cutirreacción, los atribuyó a las pocas larvas empleadas para el extracto, que para su empleo lo concentró al baño maría a 65°C, hasta reducir su volumen a la cuarta parte.

Scholtens, y col., 1966, (68) ensayaron la prueba intradérmica en cerdos infestados experimentalmente con distintas dosis de larvas. Utilizaron 0,1 ml de antígeno de Melcher, preparado por Parasitology Unit Communicable Center, que fue inyectado intradérmicamente en la piel o superficie más externa de la oreja de los animales los días 28-64 post-infección. Emplearon cuatro diluciones de antígeno que contenían: 50, 200, 500, y 1.000 microgramos de nitrógeno por ml, más un control salino. La lectura la hicieron a los 15 minutos después de la inyección y fue dada en milímetros cuadrados de induración producida. Destacan los autores la poca fiabilidad de los resultados obtenidos con este test.

II.2.- INMUNOCITOADHERENCIA

Machnika, 1977, (44) estudió el test de rosetas en triquinelosis experimental. Utilizó linfocitos aislados de sangre de conejos infestados experimentalmente con T. spiralis por vía oral. Encontró que la dosis infestiva no influye en la inmunocitoadherencia.

Boron-Kaczmarska y col., 1978, (5) evalúan la prueba de inmunocitoadherencia durante el desarrollo de triquinelosis experimental en conejos. Hicieron dos grupos de conejos, al primero le administraron 15.000 larvas a cada uno y al segundo grupo 20.000. El porcentaje de formación de rosetas fue mayor en el grupo más infectado. Concluyen que tal test es de utilidad en el diagnóstico y en la evaluación de la triquinelosis.

II.3.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HAI)

En la triquinelosis esta técnica fue aplicada por primera vez por Kagan y Margain, 1956, (31) quienes utilizando como antígeno la fracción proteica antígeno de Melcher, lograron detectar en ratas y conejos experimentalmente infectados anticuerpos a los ocho días post-infestación. La prueba resultó de sensibilidad y especificidad adecuada.

Rodríguez Osorio y col., 1972, (57) emplearon Hemaglutinación indirecta, Látex e Inmunodifusión, para diagnosticar 27 casos humanos de triquinelosis, mostrandose la primera más sensible. Sin embargo, aparecieron bastantes falsos positivos en las tres técnicas ensayadas.

En 1974, Gomez Garcia, y col., (20) aplicaron la HAI para detectar anticuerpos frente a T.spiralis, observaron que un gran número de sueros de donantes procedentes de zonas no endémicas reaccionaron positivamente, mientras que esos mismos sueros fueron negativos cuando fueron analizados mediante los tests IFI y Fijación del Complemento. Concluyen los autores que mediante el test de HAI se detecta algún factor sérico inespecífico presente en el suero de personas no afectadas por T.spiralis, factor responsable de los falsos resultados positivos detectados. Investigaron la influencia que la presencia de PCR (proteína C reactiva) en suero podría tener en la aparición de falsos positivos con el test de HAI a T.spiralis, es decir, su papel como posible factor de inespecificidad. En su estudio utilizaron dos tipos de antígenos de triquina: el del Melcher y un extracto total de larvas de T.spiralis. Con este segundo antígeno obtuvieron un total de 84,4 % de reacciones positivas, entre los sueros ensayados, con títulos comprendidos entre 25 y 400, pudiendo demostrar una relación directa entre el nivel de PCR en suero y nú-

mero de positivos en HAI, de tal forma que sueros con 1+ de PCR fueron positivos en el test HAI en el 73,8 %, con 2+ de PCR lo fueron en el 91,8 % y el 100 % cuando el suero presentaba 3+ de PCR. Con el empleo de antígeno de Melcher obtuvieron un total de 32,3 % de positivities a títulos sensiblemente más bajos. De los 96 sueros ensayados, 55 dieron falsas reacciones con el extracto total y 1 con el antígeno de Melcher. Por tanto, pusieron de manifiesto que la presencia de PCR en los sueros da lugar a reacciones inespecíficas en Hemaglutinación para triquinelosis si se emplea un extracto total del parásito, y que estas reacciones quedan prácticamente eliminadas, si se usa antígeno de Melcher.

Boznena, y col.1975 (7) utilizaron el test de HAI para el estudio de 902 sueros de personas con triquinelosis. Usaron como antígeno secciones de lengua de rata que contenían larvas de T.spiralis. También utilizaron eritrocitos formalizados y una suspensión de tanino. Compararon los resultados obtenidos con esta técnica con los obtenidos con la técnica IFI, llegando a la conclusión de que su sensibilidad es mayor que la del test de IFI, detectando dos veces más casos positivos, pero de menor especificidad. Por otra parte la HAI demostró ser más precoz que la IFI, puesto que los anticuerpos anti-T.spiralis fueron detectados ya a las dos semanas post-infección cuando se emplea HAI, lo que se produce a las cuatro semanas en el caso de la IFI.

Kagan en 1981, (32) afirmó que la HAI es de utilidad en la investigación seroepidemiológica de la triquinelosis, debido a su sensibilidad, estabilidad y facilidad de ejecución.

II.4.- FIJACION DEL COMPLEMENTO (FC)

La Fijación del Complemento ha sido adaptada para el diagnóstico de triquinelosis por diversos autores como: Witebsky y col., 1942, (78) y Jerioranska y Kicuiska, 1958, (13). Estos últimos la ensayaron en 100 casos humanos de triquinelosis, encontrando que es efectiva en el 43 % de los sueros recogidos del 13-27 día después de la infestación.

II.5.- BENTONITA

La prueba de la Bentonita fue introducida para el diagnóstico de triquinelosis por Bozicevich y col., 1951, (8) quienes destacaron que la prueba mostraba mayor especificidad y menor sensibilidad que la de FC.

Scholtens, y col., 1966 evaluaron los tests de Floculación con Bentonita, Látex, Aglutinación Suessenguth-Kline e Inmunofluorescencia Indirecta en cerdos experimentalmente infectados con distintas dosis de larvas de T. spiralis. Los tres primeros ofrecían la mejor combinación de simplicidad, fiabilidad y disponibilidad de un antígeno estable. El test de Inmunofluorescencia fue introducido porque era muy sensible, detectando anticuerpos antes del séptimo día post-infestación.

Andrzejwska y Winięcka 1978, (2) han estudiado el comportamiento de las pruebas de Bentonita, Látex e Inmunofluorescencia para la investigación de anticuerpos anti-Trichinella en sueros de 285 pacientes con triquinelosis en diversos estadios. De los resultados obtenidos deducen que existe una gran divergencia en el comportamiento de la prueba del Látex y Bentonita y que la Inmuno-

fluorescencia es superior a las de Floculación.

II.6.- LATEX

Kozar y Kozar, 1968, (37) realizaron un estudio comparativo entre distintos tests. Emplearon sueros de conejos experimentalmente infectados con 8.000 larvas y sueros de personas que habían padecido triquinelosis. Afirmaron que la prueba de Fijación del Complemento y Látex dan resultados semejantes en la detección de anticuerpos, tanto en lo que se refiere a su precocidad (44 días), como en los títulos obtenidos; por el contrario la prueba de Bentonita se muestra menos precoz, haciéndose positiva más tarde (157 días post-infestación).

Stumpf y col., 1981, (71) la utilizaron, al mismo tiempo que el test de Microprecipitación y ELISA para hacer un estudio clínico y serológico con motivo de una epidemia de triquinelosis. El método inmunoenzimático detectó el mayor número de positivos (100 %), frente al 20,5 % conseguido con el test de Látex y 98,3 % por el de Microprecipitación.

II.7.- PRUEBA DE SUESSENGUTH Y KLINE

Fue empleada por Suessenguth y Kline, 1944, (72). Utilizaron un soporte antigénico constituido por microcristales de coles-terina y como antígeno extracto salino de larvas de *T. spiralis*. En cerdos experimentalmente infestados obtuvieron reacciones positivas a los 8 días después de la infestación. Los autores indican que su método muestra una sensibilidad y especificidad semejante al test de Bentonita.

En un trabajo de Gonzalez Castro y col., 1955 (a), (21) trabajo que podemos considerar de comprobación de la técnica de Suessenguth y Kline para el diagnóstico inmunológico de la triquinelosis, los autores utilizaron sueros de diversos animales parasitados con triquinelosis espontánea y experimental, de animales parasitados por otros helmintos, y de animales sanos. También emplearon sueros humanos. Como antígeno utilizaron larvas procedentes de animales infectados con T. spiralis desecadas, trituradas y sometidas a extracción con disolvente idóneo. Este extracto antigénico lo adsorbieron sobre microcristales de colessterina, ya que el método consiste, como es sabido, en la aglutinación de partículas inertes específicamente sensibilizadas. Los resultados fueron aceptables.

Los mismos autores en un trabajo posterior, (22), amplian las experiencias con el propósito de obtener un mejor conocimiento del comportamiento de la prueba de Suessenguth y Kline para su posible aplicación al diagnóstico de rutina de las triquinelosis humana y animal. Las experiencias las realizaron con sueros de animales normales, de animales triquinosos, de cerdos espontáneamente triquinosos y no triquinosos, y de animales con otras helmintiasis. Los sueros humanos eran de diversas procedencias, encontrándose entre ellos los obtenidos de personas que habían padecido o estaban padeciendo un cuadro de triquinelosis. El antígeno fue el mismo que en el caso anterior.

Un tercer trabajo de Gonzalez Castro y col., 1959, (24) ampliando sus investigaciones sobre la eficacia de la prueba de Suessenguth y Kline para su posible utilización en mataderos de cerdos como control de esta parasitosis. Utilizaron cerdos de uno a dos meses de edad a los que infestaron con diversas dosis de larvas de triquina. Escalonaron las dosis de larvas infestantes

en cuatro series con los siguientes promedios: muy intensa, 272.450; mediana, 14.000; ligera 1.766 larvas; y muy ligera, 326. De los resultados obtenidos y de su discusión, los autores deducen que la prueba de Suenssenguth y Kline no es apta por sí sola para la vigilancia de la triquinelosis porcina en el momento del sacrificio de los cerdos y recomendaron complementarla con otras técnicas.

II.8.- MICROPRECIPITACION

Esta técnica fue descrita por Oliver Gonzalez, 1940 (51) Maus, 1940 (47) y Roth, 1941 (62). En ella se utilizan larvas de triquina, vivas, como antígeno. Encuentran baja sensibilidad, pero tuvo un alto grado de especificidad. El principal inconveniente que presentó, fue la necesidad de disponer de larvas vivas en el momento de la realización.

II.9.- INMUNOELECTROFORESIS

Despommier y col., 1974, (15) emplean la electroforesis cruzada, utilizando un antígeno larvario de T.spiralis asociado a partícula. Encuentran que es muy sensible.

Smith y Kennedy, 1984, (69) la utilizaron para demostrar la aparición secuencial de antígenos circulantes y anticuerpos durante la infestación primaria y secundaria con estos parásitos en ratón, a los que dieron 450 larvas oralmente. Emplearon como antígeno extractos larvarios de riqueza proteica 14,8 mg-ml. Concluyen que es una técnica rápida para la detección de reacciones antígeno-anticuerpo por precipitación en gel, en el cual los dos reactivos están juntos en alta concentración. La técnica resultó notable por

su simplicidad y sensibilidad y es capaz de detectar antígenos y anticuerpos simultáneamente en un test serológico. Los anticuerpos son detectados a partir del día 34 post-infección, mientras que los antígenos lo son a partir del día 15 post-infestación.

II.10.- INMUNOFLUORESCENCIA

II.10.1.- Inmunofluorescencia Directa (IFD)

Jackson en 1959, (30) fue el primero que aplicó los métodos de inmunofluorescencia directa al diagnóstico de triquinelosis. Detectó por medio de anticuerpos anti-Trichinella marcados con fluoresceína larvas en músculo de personas infectadas.

Kramar, 1967, (38) consideró el método eficaz, encontrando que era más sensible que el test de Fijación del Complemento.

Uhlikova y Hübner, 1970, (75) emplearon la IFD para el diagnóstico de triquinelosis experimental. Usaron como antígeno larvas de T.spiralis recién obtenidas de tejidos animales infectados experimentalmente. El suero problema lo obtuvieron de conejos, ratas y ratones, previamente infestados en el laboratorio. Su desventaja era la preparación de un conjugado especial para cada especie animal, pero demostró su éxito en detectar anticuerpos anti-Trichinella en todas las especies animales infectadas, incluso con 20 larvas solamente. La respuesta inmunológica estaba de acuerdo al número de larvas administradas, excepto en las ratas, en las que los resultados no demostraron correlación entre nivel de título y número de larvas. Concluyeron que la técnica mostraba gran sensibilidad.

II.10.2.- Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La técnica indirecta la emplearon Sadun y col., 1962, (67). Usaron larvas fijadas en una solución que contenía un 10 % de formalina y un 5 % de seroalbúmina efectuando la reacción en tubo. Desarrollaron el test usando 162 sueros de personas con triquinelosis, 76 sueros de personas con otras enfermedades y 27 sueros de personas sanas como control, así como sueros de 10 conejos infectados con T. spiralis. Compararon los resultados de 5 sueros positivos con los tests IFI, Bentonita, Fijación del Complemento con antígeno etanólico insoluble y la Fijación del Complemento con antígeno etanólico soluble. Encontraron que el test IFI tiene la más alta sensibilidad, detectando anticuerpos el día 7 tras la infestación, mientras que el de Bentonita no los detectó hasta el día 21 y el de Fijación del Complemento hasta el día 28.

Baratawidjaja y col., 1963, (4) emplearon la IFI para el diagnóstico de triquinelosis humana, e hicieron un estudio comparativo entre esta prueba y la Fijación del Complemento. Encuentran que la Inmunofluorescencia Indirecta es específica, más sensible y los títulos alcanzados son más altos.

Labzoffsky y col., 1964, (39) usaron como antígeno larvas vivas. Prepararon suero inmune de 2 conejos, a los que infectaron con 6.000 larvas a cada uno. Por IFI detectaron anticuerpos a los cuatro días post-infestación, mientras que con la técnica de Fijación del Complemento los anticuerpos son detectables entre los días 8-10 post-infestación. Con el test de Bentonita no encontraron positividad hasta el día 13 en un caso y el día 28 en otro. Encontraron que la sensibilidad de IFI era mayor y los títulos obtenidos eran más altos.

Sulzer, 1965, (73) estudió 68 sueros humanos con los tests Floculación con Bentonita y con IFI, usando en ambos larvas completas

como antígeno, en una solución que contenía 10 % de formalina y 5 % de seroalbúmina bovina y otro tipo de antígeno constituido por la superficie cuticular de las larvas. El test de IFI resultó muy reproducible, con los dos tipos de antígeno.

Scholtens y col., 1966, (68) emplearon como antígeno larvas vivas. Compararon los resultados de IFI, Bentonita, Aglutinación Látex y Suenssenguth-Kline, usando sueros de 10 cerdos a los que se habían dado distintas dosis de larvas de T.spiralis, y sueros de 3 cerdos sanos, como control. Encontraron que la sensibilidad de IFI era más alta que la de los otros tests usados en la evaluación.

Sulzer y col., 1966, (74) estudiaron IFI, Bentonita y Látex comparando los resultados obtenidos con 1.585 sueros humanos. También utilizaron sueros de 48 ratas (18 no infectadas con T.spiralis y 30 muy infectadas) y sueros de porcinos. Usaron como antígeno cutículas de larvas de T.spiralis. Los conjugados lo prepararon de antisueros inoculados a conejos. El test de IFI igualó al de Bentonita en reproducibilidad y la excedió en sensibilidad. En los sueros porcinos el test de IFI fue más sensible que el de Bentonita. El test de IFI detectó anticuerpos antes del día 7 post-infestación. Ninguno de los otros tests detectaron anticuerpos hasta el día 14. Cuando tomaron la última muestra en animales y humanos, el día 84 tras la infección, solo el test de IFI detectó anticuerpos en todos los sueros de los cerdos infectados con T.spiralis. La mayor sensibilidad del test IFI en comparación con los otros tests quedó clara. La evaluación de la respuesta serológica de infecciones prolongadas o de infecciones con pocas larvas es especialmente importante. Pensaron que esas dos condiciones podrían ser las responsables del gran número de resultados positivos observados en el test de IFI, en comparación a los resultados que observaron en el resto de las pruebas. Si IFI era más sensible como indicaban sus trabajos, las infecciones con pocas larvas o infestaciones de larga duración, po-

drían ser detectadas por IFI pero no por los restantes tests ensayados conjuntamente.

Choreda y col., 1976, (14) emplean la técnica de IFI con cortes congelados de tejido muscular de ratas infestadas con T.spiralis como antígeno, frente a sueros de pacientes con antecedentes de triquinelosis, sueros de pacientes con triquinelosis reciente y sometidos a tratamiento, sueros procedentes de personas con T.trichiura, con N.americanus, T.saginata y S.stercoralis. Utilizan como grupo control sueros de personas libres de parasitismo. De los resultados obtenidos los autores concluyen que los títulos de 40 y mayores pueden considerarse específicos, los de 20 dudosos y los de 10 pueden encontrarse en otras infestaciones parasitarias y en sueros no infectados.

Rodriguez Osorio y col., 1977, (59) han encontrado que la prueba de IFI para la triquinelosis utilizando como antígeno larvas de triquina, da falsas reacciones positivas en sueros procedentes de pacientes con fiebres tifoideas o paratifoideas, aunque el porcentaje de las mismas es bajo y los títulos también lo son. La existencia de estas reacciones cruzadas indican que hay antígenos compartidos por *Salmonella* y *Trichinella* spp.

Stumpf y col., 1981, (71) incluyeron la Inmunofluorescencia Indirecta, junto con la Microprecipitación, Hemaglutinación Indirecta y ELISA entre las técnicas serológicas que mostraron mejores resultados en cuanto a especificidad y que pueden ser utilizadas con más probabilidad de éxito para detectar una triquinelosis.

La detección temprana de las infestaciones es probablemente rara ya que los sueros humanos no son usualmente sometidos al diagnóstico hasta que no aparecen los síntomas clínicos; eso es, hasta que la enfermedad no está en su fase aguda. Desde ese punto de

vista los trabajos de Labzoffsky y col., 1964, (39) son valiosos, ya que el test de IFI puede detectar anticuerpos en suero muy tempranamente después de la infestación.

II.11.- ELISA

Fue aplicado para el diagnóstico de triquinosis por primera vez por Ruitenbergh y col., 1974,1975,1976, (63,64,65).

Para la detección de antígenos circulantes de T.spiralis en sueros de animales con triquinosis experimental por Rodriguez-Osorio y Gómez García, 1978, (60) quienes emplearon técnicas inmunoenzimáticas, por considerarlas de gran sensibilidad.

Van Knapen y col., 1981,(76) emplearon el test ELISA junto con el de IFI, para hacer un estudio comparativo en monos infectados con T.spiralis. Resultaron de alta sensibilidad, muy reproducibles ambos.

Cironeau y col., 1981, (12) encuentran mayor precocidad en la detección de anticuerpos circulantes por la técnica ELISA (8 días) que por el test de Microprecipitación (día 22).

Yang, 1982, (81) ve que existen reacciones cruzadas entre T.spiralis, T.canis y A.suum utilizando el test ELISA. Emplea sueros de conejos experimentalmente infestados con larvas de T.spiralis.

De las pruebas mencionadas, las más adecuadas para el diagnóstico de la triquinosis son las pruebas de partículas inertes, como la Microprecipitación, las de Inmunofluorescencia y las Inmunoenzimáticas (ELISA).

Las primeras, son aconsejables como medios de rutina, por su facilidad de ejecución y rapidez. Las otras más complejas, están indicadas para la confirmación de casos dudosos.

III.- JUSTIFICACION

III.- JUSTIFICACION

De lo hasta aquí expuesto se desprende que la triquinelosis humana sigue en la actualidad siendo, en todo el mundo, un problema clínico y sanitario importante.

La aparición de esporádicos brotes epidémicos es un hecho en muchas provincias españolas, con ciclos anuales en algunas, destacando, en este sentido la zona del sur oeste español.

Por otra parte, el curso clínico de la enfermedad en el hombre hace que en los brotes epidémicos la sospecha se establezca de forma indirecta, en base a los caracteres epidemiológicos de los mismos y raramente por la sintomatología clínica asociada a las personas afectadas, dado que los signos y síntomas de la triquinelosis humana, sobre todo al principio del proceso, son fácilmente confundibles con los ocasionados por agentes etiológicos muy diversos, por lo que siempre se hace necesaria, ante una sospecha de triquinelosis, la confirmación del diagnóstico presuntivo mediante la realización de pruebas de laboratorio adecuadas.

De los posibles métodos de diagnóstico de laboratorio que teóricamente podrían utilizarse en la triquinelosis, los únicos viables en la práctica son los serológicos, dirigidos a la detección y cuantificación de anticuerpos específicos anti-Trichinella o de antígenos de T.spiralis en el suero del sospechoso.

Aunque son muchas las técnicas serológicas que en la literatura especializada aparecen aplicadas al diagnóstico serológico de la triquinelosis humana, por desgracia, hasta el presente, no puede decirse que ninguna resuelva definitivamente todos los problemas planteados, unas por falta de sensibilidad, otras por falta de especificidad y todas porque al no estar comercializadas no son de

aplicación a la práctica rutinaria en cualquier laboratorio de análisis clínicos. Esto hace que tales técnicas estén relegadas a laboratorios de investigación que por su especialización e infraestructura pueden mantener pruebas diagnósticas adecuadas, en las que algunos de los reactivos importante, como los antígenos necesariamente han de ser preparados en ellos.

Es precisamente la conjunción de estas dos circunstancias: falta de técnicas estandarizadas para el serodiagnóstico rutinario de la triquinelosis humana y que Sevilla y su zona de influencia constituyan una parte del territorio español en el que con relativa frecuencia se dan brotes epidémicos de esta enfermedad parasitaria, lo que nos han movido a la realización de los trabajos que constituyen la presente Memoria de Linceiatura, cuya finalidad es, por una parte montar y valorar un test serológico de Inmunofluorescencia Indirecta, adecuado en nuestras condiciones de trabajo para el diagnóstico de la triquinelosis humana y, por otra, la realización de una encuesta epidemiológica entre población teóricamente sana, que permita conocer y valorar la incidencia real del parasitismo en el hombre, detectando casos subclínicos que, como se conoce en otros países, constituyen la mayoría del total.

IV.- MATERIAL Y METODOS

IV.1.- MATERIAL

IV.1.1.- LOS PARASITOS

IV.1.1.a.- Trichinella spiralis

La cepa de T.spiralis utilizada en el presente trabajo fue cedida por el Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada y viene siendo mantenida desde el año 1984 en nuestro laboratorio por pases ratón-ratón.

IV.1.1.b.- Ascaris suum

Los adultos de A.suum necesarios para la preparación de los inmunisueros empleados en la valoración de la técnica IFI, proceden de cerdos naturalmente parasitados y sacrificados en el Matadero MercaSevilla. Los parásitos fueron recogidos "in situ", colocados en un recipiente isoterma con solución salina a 37°C y trasladados al laboratorio. Una vez en él, los adultos de Ascaris fueron repetidamente lavados en solución salina y finalmente congelados a -80°C, conservándose en estas condiciones hasta el momento de su utilización para preparar los correspondientes extractos antigénicos.

IV.1.1.c.- Fasciola hepatica

Así mismo, los adultos de F.hepatica fueron conseguidos a partir de hígados de vacuno, con parasitismo espontáneo, sacrificados en MercaSevilla. Para ello, los hígados afectados fueron disecados cuidadosamente, recogiendo todos los parásitos localizados en los canalículos hepáticos. Tras repetidos lavados en solución salina, fueron conservados a -80°C hasta su utilización.

IV.1.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Para el mantenimiento de la cepa de T.spiralis, y la obtención de inmunisueros se han utilizado ratones, ratas y conejos.

Ratones albinos, raza albina, cepa OF-1, de aproximadamente 20 g de peso, suministrados por Panlab y criados posteriormente en el animalario del Departamento.

Ratas blancas, raza Nestlé, de unos 150 g de peso suministradas por el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Conejos Neozelandeses, de 3 Kg de peso, con garantía sanitaria, suministrados por Biocentre.

IV.1.3.- REACTIVOS

IV.1.3.a.- Inmunisueros

Para la valoración del test de IFI desarrollado en este

trabajo se han empleado:

- 1- Sueros positivos anti-T.spiralis, preparados en el propio Departamento de acuerdo con el método indicado más adelante.
- 2- Sueros positivos anti-A.suum, preparados en el Departamento.
- 3- Sueros positivos anti-F.hepatica, preparados en el Departamento.
- 4- Suero positivo anti-T.gondi comercialmente preparado y adquirido a BioMerieux (Ref. 7541).
- 5- Suero positivo anti-T.pallidum, comercialmente preparado y adquirido a BioMerieux (Ref. 72191)

IV.1.3.6.- CONJUGADOS FLUORESCENTES

Se han utilizado dos tipos de conjugados fluorescentes, ambos comercialmente disponibles en el mercado:

- 1- Anti-globulinas totales de suero de conejo marcadas con fluoresceína, de Immunological Laboratories (Ref 7210).
- 2- Anti-globulinas totales de suero humano, marcadas con fluoresceína, de BioMerieux (Ref 72191).

IV.1.4.- MICROSCOPIO

La lectura de resultados en el test de IFI se ha efectuado en un Microscopio Dialux 22/22 EB Leitz, dotado de sistema de fluorescencia en epi-iluminación 3- λ Ploemopak, con filtro excitador BP 450-490, y filtro ocluser LP 515.

IV.2.- METODOS

IV.2.1.- INFESTACION EXPERIMENTAL DE ANIMALES CON T.SPIRALIS

Tanto cuando se realizaron pases de T.spiralis ratón-ratón para mantenimiento de la cepa, como cuando se infestaron animales para la obtención de larvas en masa previo a la preparación del antígeno utilizado en el test de IFI, o a los extractos antígenicos para conseguir los inmuniseros, el método seguido fue el mismo, variando únicamente la dosis infestante en función del animal usado, rata o ratón y que, en esencia, coincide con el empleado en la mayoría de las infestaciones experimentales de T.spiralis, en las que los diferentes investigadores tienden a imitar la forma espontánea y natural en que esta infestación se origina; es decir, por administración oral de las fases infestantes de T.spiralis.

Para este propósito se ha seguido básicamente la técnica de Kozar y Kozar, 1963, (36), con ligeras modificaciones. Ratones infestados experimentalmente con T.spiralis al menos un mes antes, fueron sacrificados por intoxicación con éter. Mediante disección se separan diafragma, maseteros, intercostales y musculatura de extremidades inferiores, y superiores. Estos restos musculares fueron divididos en pequeños trozos, que fueron colocados entre las láminas de un triquinoscopio, contándose y anotándose el número de larvas de T.spiralis presentes, en cada uno de ellos.

Para confeccionar el inóculo, con el número de larvas infestantes necesario en cada caso, se procedió a mezclar varios de los trozos de carne parasitada hasta conseguir una masa en la que se encontrase el número de larvas deseado, preparándose en

cada caso tantos inóculos como animales estuviese previsto infestar.

Por regla general, la dosis infestante utilizada en todos los casos fue 100 ± 5 larvas, para ratones, y 1.500 ± 10 para ratas, dosis naturalmente individuales.

Para facilitar la ingestión del inóculo, los animales a infestar se mantuvieron las 24 horas previas a la infestación en ayunas y la carne infectada se les administró mezclada con azúcar y queso rallado, desechando el empleo de harina y agua para preparar el inóculo, pues, en nuestras condiciones de trabajo, este procedimiento no ofreció buenos resultados. En cada caso, se comprobó que los animales llegaron a ingerir la totalidad del inóculo, para ello se colocaron por separado en cubículos independientes hasta que consumieron la totalidad del inóculo.

El conjunto de animales utilizados a lo largo del presente estudio, para conseguir el antígeno de triquina necesario tanto para el test IFI, como para la preparación de los extractos antigénicos, fue aproximadamente de unos 300 ratones y unas 80 ratas.

IV.2.2.- OBTENCION Y PURIFICACION DE LARVAS DE T.SPIRALIS

IV.2.2.1.- Obtención de las larvas de T.spiralis.

A partir de ratas (preparación de extractos antigénicos de T.spiralis), o de ratones (obtención de antígenos de T.spiralis para realizar el test de IFI), infectados en las condiciones indi-

cadadas en el apartado anterior y con igual metodología, se aislaron diafragma, intercostales, maseteros, etc.

Estas masas musculares fueron someramente trituradas con tijeras y sometidas a digestión artificial para facilitar la liberación de las larvas enquistadas.

En esta fase se han probado las técnicas de Larsh y Kent, 1949, (40) y de Sulzer, 1965, (73) así como algunas modificaciones a las mismas.

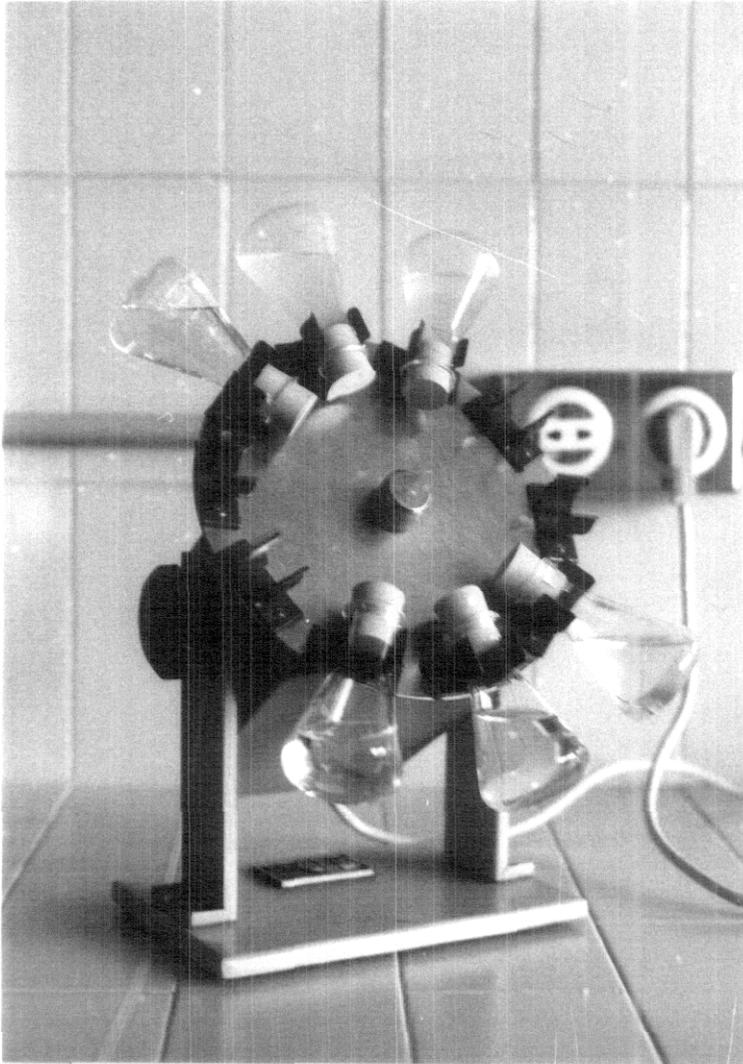
La digestión se realizó en matraces de 50 ml de capacidad, en los cuales iba el líquido digestivo junto con la carne triturada. Estos matraces se acoplaron a un aparato de agitación orbicular, (fotografía 1), ajustado a 15 r.p.m., de esta forma todo el digerido (carne más líquido digestivo) recibieron movimientos constantes que ayudaron al proceso digestivo de la carne y a la consiguiente liberación de las larvas de T.spiralis de sus "quistes".

Todo este dispositivo (aparato más matraces) fue introducido en una estufa a 37°C.

Las técnicas seguidas se enumeran a continuación:

1.- Técnica de Sulzer original 1965 (TSO).

- Por cada 25 g de carne se añade 1 l. de líquido de digestión.
- El líquido de digestión está constituido por 1 % de pépsina en agua de grifo y 0,5 % de ácido clorhídrico.
- Agitar la carne junto con el líquido durante 18 horas a 37°C.
- pH 2,3-2,6



Fotografía N° 1

- 2.- Técnica de Sulzer modificación A (TSA).
 - Tiempo de digestión 16 horas.
- 3.- Técnica de Sulzer modificación B (TSB).
 - Tiempo de digestión 6 horas.
- 4.- Técnica de Sulzer modificación C ((TSC)).
 - Temperatura de digestión 38°C.
 - Tiempo digestión 1,5 horas.
- 5.- Técnica de Larsh y Kent 1949 (modificación Gonzalez Castro y col., 1972) (TLK).
 - 1 g de carne por cada 25 ml de solución digestiva.
 - Solución digestiva constituida por 1 % de ácido clorhídrico concentrado y 0,7 % de pépsina.
 - Tiempo digestión 1 hora.
 - pH 1,6-1,8
- 6.- Técnica de Larsh y Kent modificación A (TLKA).
 - Tiempo de digestión 3 horas.

En todas las soluciones digestivas hemos utilizado pépsina 2000 FIP/U g de Merck, pH 1,7, Ref 7190.

Tras los ensayos pertinentes la técnica de digestión seguida por nosotros en este trabajo ha sido la número 6, Técnica de Larsh y Kent original pero con tiempo de digestión aumentado a 3 horas.

IV.2.2.2.- Purificación de las larvas de T. spiralis

Tras el proceso de digestión, las larvas de triquina quedan liberadas de los "quistes", manteniendo perfectamente su movilidad; sin embargo, tras esta etapa, siempre quedan pequeños restos musculares sin digerir procedentes del hospedador, que hay que separar de las larvas a fin de que posteriormente no interfieran durante la fase de obtención de inmunisueros o de realización del test de IFI; en definitiva, tras la digestión debe realizarse un proceso de purificación de la suspensión larvaria.

Para ello se ha seguido la Técnica de Bozicevich y col., 1951, (8) modificada por Gonzalez Castro y col., 1972, (25).

Se utilizó un dispositivo, (figura 3), que constaba de un soporte con aro, en el que se colocó un embudo de adecuada capacidad. En el pico del embudo se adaptó un trozo de tubo de goma corto, que por el extremo inferior iba acoplado a un tubo de centrifuga graduado. Dentro del embudo se puso un doble aro que soportaba una malla de tul con espacios circulares de 0,5 mm de diametro y sobre ésta se dispuso 5-6 capas de gasa de 21 hilos x cm².

Al tubo de cintrífuga se adicionó 10 ml de una solución de carboxi-metil-celulosa, Panreac^R, Ref 142416, al 2 % (concentración óptima para este propósito, que fué determinada tras realizar varias pruebas con diferentes diluciones de CMC en agua destilada- 3,5; 2,5; 2; 1,5;- resultando la concentración 2 % la única que permitía el avance de las larvas a través de ella, impidiendo al mismo tiempo, que el resto de sustancias del digerido pasasen. Las diluciones 3,5 y 2,5 fueron demasiado densas, no consiguiendo las larvas moverse por ella, mientras que la del 1,5 % era de tan baja densidad que se mezclaba con todo el dige-

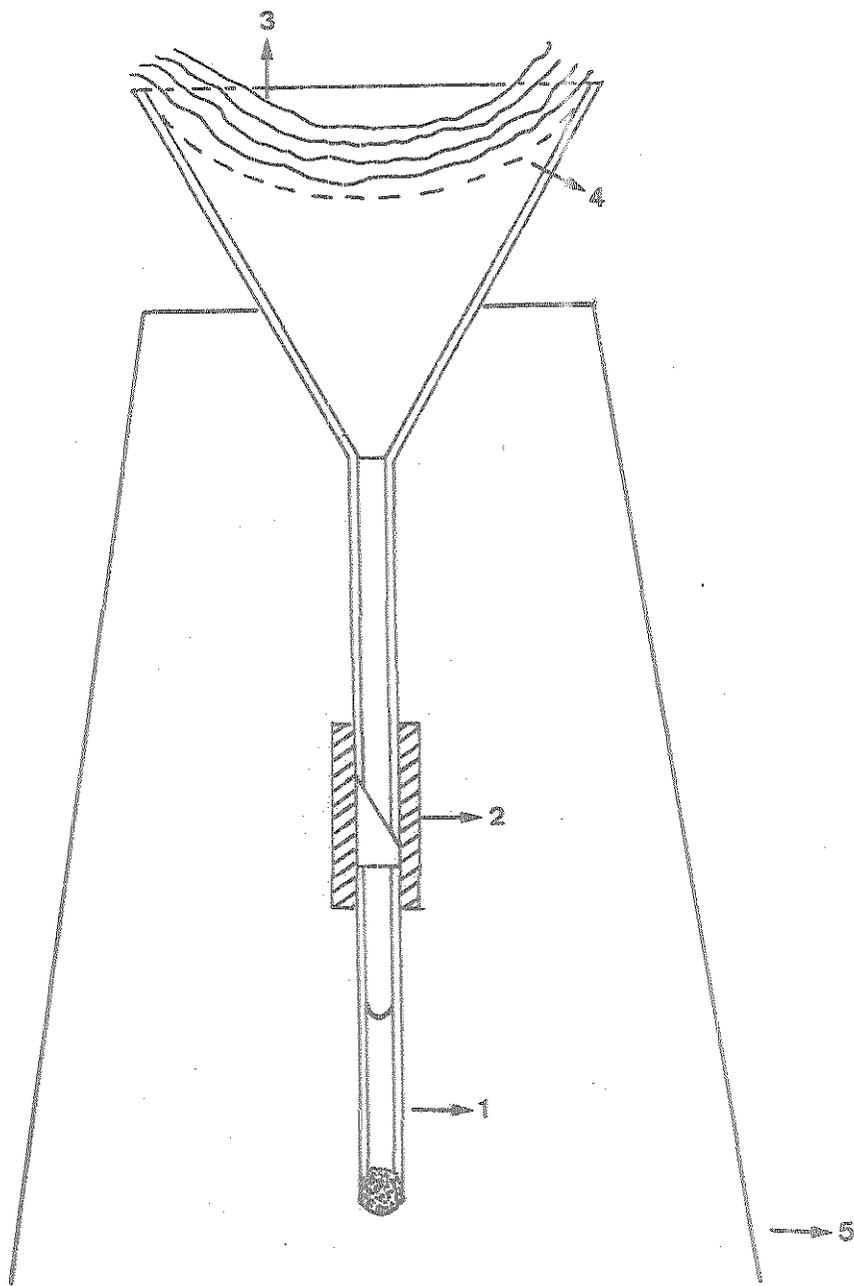


Figura nº 3: Embudo utilizado en la purificación de las larvas.
1.: Carboxi-metil-celulosa.
2.: Tubo de goma.
3.: Capas de gasa.
4.: Tul.
5.: Soporte.

rido).

La CMC se preparó disolviendo 2 g de CMC en 100 ml de agua destilada, dejando reposar 24 horas para que la CMC absorbiera el agua, y centrifugando en centrífuga refrigerada (tipo OTD 50 Sorvall) a 3000 r.p.m. durante 2 horas, con el fin de eliminar restos celulósicos no solubles de CMC. Se decantó el supernadante con cuidado para no arrastrar impurezas del sedimento, siendo este supernadante el que se utilizó en el dispositivo descrito anteriormente.

Una vez adaptado el tubo de centrífuga que llevaba la solución de CMC al tubo de goma del dispositivo, se vertió lentamente por el embudo, y a través de las capas de gasa y tul, una pequeña porción del digerido, de forma que quedase superpuesto, sin mezclarse, a la solución de CMC. Después se continuó adicionado digerido hasta llenar por completo el sistema, esto es, hasta que el digerido quedase a unos 4 cm del borde superior de la gasa.

Se mantuvo 2 horas en sedimentación en estufa a 37°C. Durante este tiempo las larvas, gracias a su movilidad, pudieron migrar a través de la CMC, buscando siempre una zona más limpia, con lo que se separaron del resto de digerido, el cual quedaba superpuesto con la solución de CMC.

Tras este tiempo se desconectaron del dispositivo los tubos de centrífuga. En cada tubo se sifonó con cuidado el líquido supernadante menos 1 ml del fondo. De esta forma el sedimento larvario quedaba a suficiente distancia de la superficie del líquido remanente (1ml) evitando su remoción y el arrastre de larvas por el sifonado.

El sedimento obtenido se resuspendió en 5-10 ml de so-

lución salina. Se superpuso sobre 6 ml de CMC al 2 % contenida en otro tubo de centrífuga y se dejó sedimentar hasta que todas las larvas estuvieron en el fondo del tubo; se decantó el sobrenadante, y con el sedimento de larvas, se repitió la misma manipulación.

Finalmente, se lavaron las larvas 3 o 4 veces en solución salina para eliminar los restos de CMC, usando el mismo proceder de suspensión, sedimentación y decantación cada vez que se cambió la solución salina.

El resultado final es la obtención de larvas totalmente puras, libres de tejidos del hospedador y de CMC, con lo cual dichas larvas tuvieron garantía suficiente para ser empleadas en la elaboración de extractos antigénicos destinados a inmunización de animales, y como antígeno en el test de IFI ensayado.

IV.2.3.- PREPARACION DE EXTRACTOS ANTIGENICOS

IV.2.3.1.- Extractos totales de T.spiralis.

Las larvas de T.spiralis purificadas y liofilizadas, fueron reducidas a polvo fino por trituración en mortero de ágata, comprobando el grado de la misma por controles microscópicos.

Para cada 10 ml de solución salina estéril se colocó el triturado de larvas obtenidas a partir de 15 ratas infestadas, dejan-

dose macerar 24 horas a 4°C., agitándose durante este tiempo unas ocho veces. Seguidamente la suspensión se centrifugó a 3000 r.p.m., durante 20 minutos, en centrifuga refrigerada (modelo VIRTIS, USA).

En el supernadante, tras ser esterilizado por filtración, se determinó la riqueza proteica por la técnica de Lowry, ajustándose esta a una concentración de 6 mg-ml. Finalmente el extracto obtenido fue congelado a -80°C, repartido en alicuotas de 10 ml.

IV.2.3.1.- Extractos totales de F.hepatica y A.suum.

Los adultos de F.hepatica fueron liofilizados y posteriormente triturados en un homogeneizador (tipo VINELAND,N.5, USA, con pistilo de teflón), en frio.

El triturado se pasó a maceración en solución salina, durante 24 horas, a 4°C, con agitaciones periódicas.

El extracto fue centrifugado y filtrado, igual que en el caso anterior, ajustándose su concentración proteica a 6 mg-ml antes de conservarlo a -80°C.

Los extractos totales de A.suum fueron preparados de igual forma que los de F.hepatica, la única diferencia consistió en el empleo de mortero de ágata, en sustitución del homogeneizador, para la trituración de los adultos del parásito.

El método de Lowry seguido para valorar la concentración proteica de los extractos antigénicos fue el siguiente:

Se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo

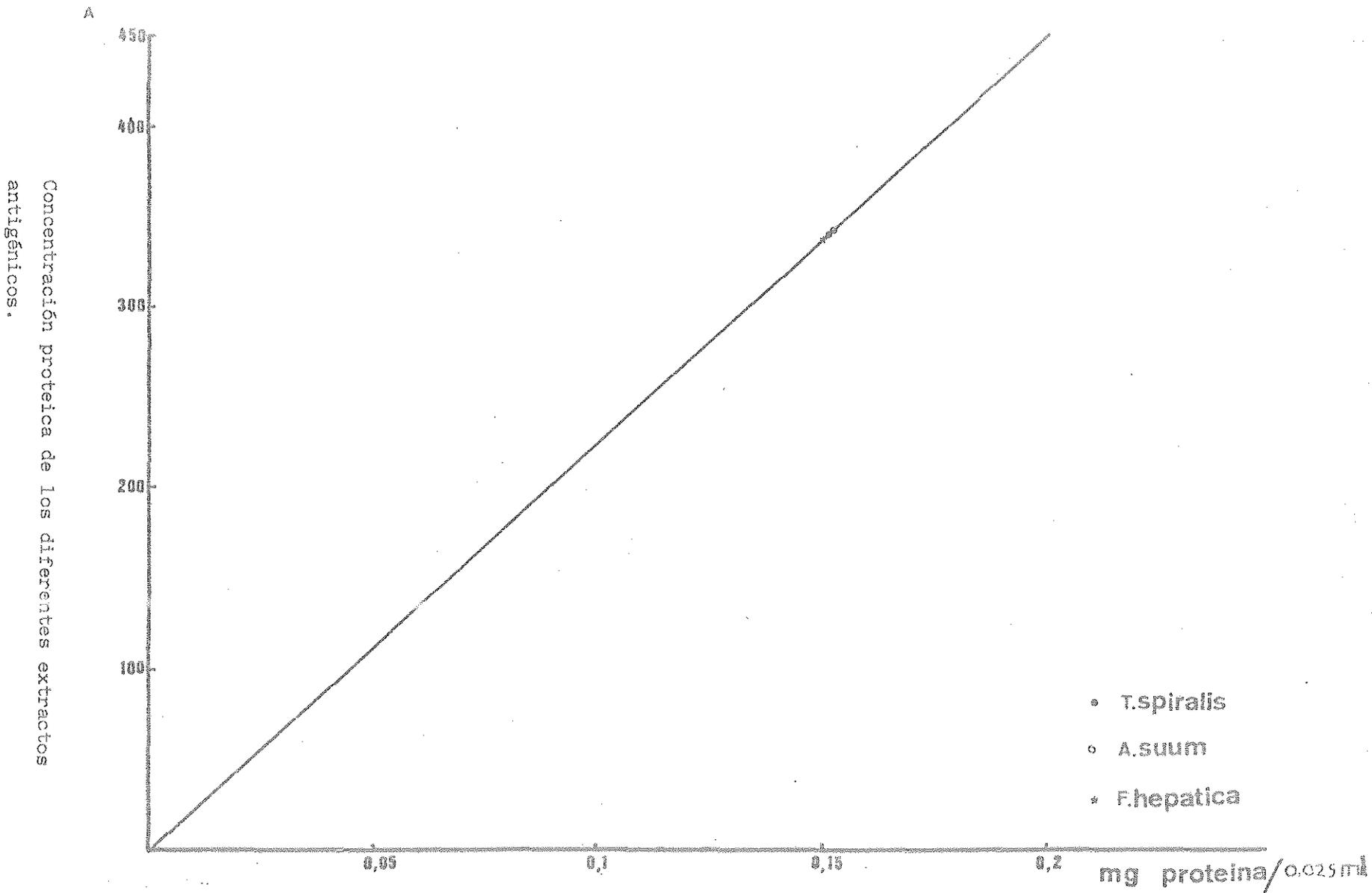
de Folin-Ciocalteu dando un complejo coloreado. El color se forma debido a la reacción del Cu^{2+} con la proteína en medio alcalino, como en el método de Biuret. El reactivo de Folin es una disolución de tungstato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y clorhídrico. Los productos y reactivos empleados han sido:

- $\text{SO}_4 \text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - Tartrato sódico potásico
 - Na OH
 - $\text{CO}_3 \text{Na}_2$
 - Reactivo de Folin
 - Albumina
-
- Solución a: $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ al 2 % en Na OH 0,1 N
 - Solución b: $\text{SO}_4 \text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,5 % en tartrato sódico potásico al 1 %.
 - Solución c: 50 ml de (a) más 1 ml de (b), preparada en el momento de utilizar.
 - Solución d: reactivo de Folin diluido 1/2 en agua.
 - Curva patrón de Albumina: a partir de una disolución de 0,5 mg-ml.

Se procedió así:

- Mezclar un volumen de Folin determinado con un volumen igual de agua.
- Añadir a cada muestra problema 5 ml de la Solución c, esperar 4 minutos.
- Añadir 0,5 ml de la Solución de Folin en agua. Esperar 30 minutos.
- Leer en el espectrofotómetro.

Los resultados para cada extracto antigénico quedan reflejados en la siguiente gráfica:



IV.2.4.- OTENCION DE INMUNISUEROS

La obtención de sueros inmunes frente a T.spiralis, A.suum y F.hepatica se realizó en conejos, siguiendose en todos los casos las mismas pautas. Se inyectaron por via subcutánea volúmenes fijos de cada uno de los extractos antigénicos mencionados a intervalos fijos de tiempo.

El volumen de extracto antigénico empleado en cada dosis inmunizante fue de 1 ml (concentración proteica aproximadamente 6 mg-ml), unido a 1 ml de coadyudante completo de Freud y 1 ml de una solución de penicilina-estreptomocina (150.000 UI penicilina, 1 g de estreptomocina).

Estas dosis fueron administradas cada 48 horas durante 14 días, comenzando el 18 de Febrero y finalizando el cuatro de Marzo, en total ocho dosis inmunizantes.

Finalizado el período de inmunización, se hicieron sangrias a los animales a partir de la vena marginal de la oreja; recogiendo de cada animal unos 10 ml de sangre, de los que finalmente se consiguieron aproximadamente 4 ml de suero inmune. Este fue repartido en alicuotas de 50 μ l y congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

IV.2.5.- TEST DE IFI PARA TRIQUINELOSIS HUMANA

Básicamente el test ensayado y valorado para serodiagnóstico de triquinelosis humana y animal en este trabajo es el de Baratawidjaja y col., 1963, (4), utilizando en todos los casos como soporte del antígeno portas para inmunofluorescencia con pocillos de 6 mm de diámetro (BioMerieux, ref 75751).

Como antígeno se han utilizado larvas de T.spiralis preparadas como se indica en el apartado IV.2.2. En unos casos las larvas se utilizaron "in toto", mientras que en otros previamente a su fijación al porta fueron sometidas a sonicación en baño sonicador (tipo Ultrasons (S) durante 45 minutos, añadiéndose al porta volúmenes fijos del producto obtenido.

Para establecer las mejores condiciones de fijación del antígeno de T.spiralis a los portas de inmunofluorescencia se han probado las siguientes condiciones de fijación:

- a.- Larvas suspendidas en solución salina y secado en estufa a 37°C, 4 horas.
- b.- Larvas suspendidas en solución salina y secado en estufa a 37°C, 4 horas, más inmersión en acetona durante 5 minutos.
- c.- Larvas suspendidas en agua bidestilada, secado en estufa a 37°C, 4 horas, más tratamiento en acetona durante 5 minutos.
- d.- Larvas suspendidas en agua bidestilada, secado en estufa a 37°C, 4 horas, flameo suave a la llama y tratamiento con acetona durante 5 minutos.
- e.- Igual que en el caso anterior, prolongando el tratamiento con acetona durante 10 minutos.

De todas las condiciones de fijación indicadas, la que mejor resultado dió en cuanto a la persistencia de las larvas sobre el porta tras repetidos lavados en PBS fue la (e), de tal forma que todas las titulaciones realizadas en este trabajo lo han sido empleando esta forma de fijación del antígeno.

Dadas las características de las larvas de T. spiralis como antígeno, se desprende fácilmente que los títulos obtenidos en cualquier suero positivo en el test de IFI dependerán de la concentración antigénica utilizada; es decir, del número de larvas frente a las que se prueben las distintas diluciones de los sueros problemas, por ello a la hora de estandarizar en nuestro laboratorio el test de IFI a T. spiralis, otro de los aspectos valorados ha sido la influencia que sobre los resultados tendría la utilización de suspensiones larvarias más o menos concentradas. Para esta comprobación se prepararon 40 portas, cada uno con 10 pocillos, distribuidos en 4 lotes de 10. En el lote número 1 se fijaron 3 larvas de T. spiralis por pocillo, 6 en el lote número 2, 9 en el lote número 3 y 12 en el lote número 4. Utilizando este conjunto de portas se determinó los títulos obtenidos en cada caso con los sueros positivos y negativos preparados al efecto como se indica en el apartado IV.2.4.

El empleo de 12 larvas por pocillo, como puede observarse en el apartado de resultados, provocó la obtención de títulos en los sueros positivos anti-Trichinella muy próximos a los obtenidos con sueros negativos, con lo que la interpretación del test resulta difícil. Por el contrario el empleo de 3 o 6 larvas por pocillo, si bien ofrecía una interpretación de resultados correcta hacía que los mismos fueran inconstantes, de tal manera que la concentración de 9 larvas por pocillo ha sido considerada como idónea y la empleada en las titulaciones de los sueros problemas

estudiados.

De acuerdo con las consideraciones antes indicadas la realización del test de IFI ensayado y propuesto para utilización rutinaria en este trabajo se desarrolló en las siguientes etapas:

1.- Fijación del antígeno

- A cada pocillo de los portas se añadió 25 μ l de una suspensión en agua bidestilada de larvas vivas de T.spiralis con una riqueza tal que por cada 25 μ l contenía 9 larvas.
- Secado en estufa a 37°C, 4 horas.
- Flameado a la llama suave.
- Inmersión durante 10 minutos en acetona.

2.- Reacción antígeno-anticuerpo

- Diluciones seriadas de los sueros desde suero puro a 1:512.
- Añadir 25 μ l de cada una de las diluciones de los sueros a los pocillos del porta.
- Incubar en cámara húmeda a 37°C, durante 30 minutos.
- Lavar dos veces durante 10 minutos cada vez en PBS.
- Secar al aire.

3.- Incubación con el conjugado fluorescente.

- Preparar en solución de azul de Evans 1:10,000 diluciones 1:400 y 1:40 de los conjugados anti- -globulina humana y anti- -globulina de conejo respectivamente.
- Añadir a cada pocillo 25 μ l de la dilución de conjugado adecuado.
- Incubar en cámara húmeda en estufa a 37°C, durante 30 minutos.

- Lavar 2 veces durante 10 minutos cada vez en PBS.
- Secar al aire.

4.- Montaje y observación

- Los portas fueron cubiertos con cubre objetos de tamaño adecuado, utilizando como medio de montaje glicerina anhidra de pH ligeramente alcalino (aproximadamente 8).

En todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos para seguimiento de la técnica y se consideró como título de un suero la inversa de la mayor dilución del mismo que dió positivo.

IV.2.6.- VALORACION DEL TEST DE IFI

La credibilidad de cualquier procedimiento inmunológico viene determinada por cuatro parámetros:

- Precisión, exactitud, sensibilidad y especificidad.

Precisión es un término que se refiere a la magnitud de las diferencias entre resultados cuantitativos obtenidos en repetidos análisis de la misma muestra, independientemente del verdadero valor de la sustancia medida. Cuantas menores sean las diferencias entre los resultados obtenidos con ensayos repetidos mayor será la precisión del método. La sensibilidad de un método inmunológico suele ser considerada habitualmente como su capacidad para señalar la presencia de una baja concentración de un componente de interés. Cuanto menor sea la cantidad de una sustancia detectada por un método mayor será la sensibilidad de éste. En

contraposición la especificidad se refiere a la capacidad de un método para producir un resultado negativo cuando el verdadero estado de la muestra es negativo.

Normalmente la valoración de los parámetros aludidos puede ser realizada en función de cálculos matemáticos. En nuestro estudio y de acuerdo con Palmer y Cavallaro, (53) para el cálculo de la precisión se utiliza la desviación estándar (S), siendo ésta la expresión más común que se emplea para describir la dispersión de las mediciones repetidas:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Se puede obtener una medida aproximada de la sensibilidad de la prueba teniendo en cuenta el número de falsos negativos que se producen mediante el siguiente cálculo:

$$\text{Índice de sensibilidad} = \times 100 \frac{\text{VER. (+)} - \text{FAL. (-)}}{\text{VERDADEROS (+)}}$$

Por otra parte la especificidad del método puede calcularse de forma similar a la utilizada para obtener el índice de sensibilidad, salvo que el número de falsos (+) se coloca en el numerador y el de verdaderos (-) en el denominador:

$$\text{Índice de especificidad} = \frac{\text{VER. (-)} - \text{FAL. (+)}}{\text{VERDADEROS (-)}} \times 100$$

En el presente trabajo para la determinación de los parámetros antes indicados se han programado y realizado las siguientes experiencias.

Como suero positivo se han utilizado los obtenidos a

partir de conejos sanos inmunizados con antígeno de T.spiralis. Como suero negativo los obtenidos de conejos sanos inmunizados frente a F.hepatica y A.suum, así como sueros humanos positivos a T.gondii y T.pallidum comercialmente preparados.

Para cada experiencia se han utilizado diluciones seriadas de los sueros indicados comenzando por suero puro y llegando a la dilución máxima de 1:512, utilizandose duplicados para cada dilución de suero. En estas condiciones las experiencias se han repetido cuatro veces y con los resultados obtenidos de acuerdo con lo indicado anteriormente se han determinado los índices de precisión, sensibilidad y especificidad como se indica en el apartado de discusión.

Los parámetros han sido calculados para el antígeno constituido por larvas enteras.

Así mismo se ha comprobado la incidencia que sobre la precisión y sensibilidad del test tiene el estado físico del antígeno utilizado. Para ello se han valorado sueros positivos y negativos frente a antígeno constituido por larvas completas y recién purificadas, por larvas completas congeladas a -20°C durante 30 días y por larvas sonicadas.

IV.2.7.- ENCUESTA SEROEPIDEMIOLOGICA

Determinadas las condiciones de utilización del test IFI para serodiagnóstico de triquinelosis humana y valorado su comportamiento, el test ha sido utilizado en la realización de una encuesta seroepidemiológica entre población humana potencialmente sana a fin de detectar la incidencia de este parasitismo entre este gru-

po de población y entre población enferma por etiologías diversas y distintas en principio a parasitismo por T. spiralis.

Para ello se ha utilizado 328 sueros de cuatro procedencias distintas:

- Cruz Roja.
- Laboratorio Municipal.
- Sierra de Huelva.
- Hospital Virgen del Rocío.

Los sueros recogidos en la Cruz Rojo proceden de donantes voluntarios de sangre, los procedentes del Laboratorio Municipal corresponden a personas que por su actividad profesional vinculada a hostelería y alimentación se someten periódicamente a control sanitario, los procedentes de la Sierra de Huelva corresponden a muestras recogidas al azar entre población femenina de la zona y finalmente los sueros suministrados por el Hospital Virgen del Rocío proceden de enfermos encamados en el mismo aquejados de diferentes procesos patológicos.

Todos los sueros indicados han sido valorados cuantitativamente por el test IFI a T. spiralis según las pautas indicadas en anteriores apartados, incluyendose siempre controles positivos y negativos.

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

V.- RESULTADOS Y DISCUSION

V.1- SOBRE INFLUENCIA DE LAS DIFERENTES TECNICAS DE DIGESTION ENSAYADAS.

Los resultados obtenidos sobre la influencia que el proceso de digestión ejerce en la viabilidad de las larvas de T.spiralis, se esquematizan el cuadro nº 1.

Como se observa en él, de las seis variantes empleadas, la denominada TLKA que corresponde a la Técnica de digestión de Larsh y Kent modificada en el sentido de aumentar el tiempo de tratamiento de la carne triquinosa con el jugo digestivo artificial de 1 a 3 horas, fue la que ofreció mejores resultados. En efecto, fue la única que permitió recuperar las larvas de triquina al final del proceso totalmente intactas y altamente móviles, condiciones indispensables para conseguir una posterior purificación correcta de la suspensión larvária. Es esta técnica, por tanto, la que hemos utilizado a lo largo del trabajo.

=====

CUADRO 1: RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS DIFERENTES TECNICAS DE DIGESTION ENSAYADAS.

TSO: Técnica de Sulzer Original. ; TSA: Técnica de Sulzer modificación A. ; TSB: Técnica de Sulzer modificación B. ; TSC: Técnica de Sulzer modificación C. ; TLK: Técnica de Larsh y Kent. ; TLKA: Técnica de Larsh y Kent modificación A.

=====

TECNICA	ESTADO FINAL DE LAS LARVAS
TSO	Las larvas aparecen muertas al final del proceso.
TSA	" " " " " " " " "
TSB	" " " " " " " " "
TSC	Larvas vivas pero escasamente móviles.
TLK	" " " " "
TLKA	Larvas vivas y muy móviles.

=====

V.2.- SOBRE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ANTIGENO EN LOS TITULOS DE ANTICUERPOS OBTENIDOS EN EL TEST IFI PARA TRIQUINELOSIS.

Como se indica en Material y Métodos, la posible influencia que la concentración de larvas de triquina en la suspensión utilizada como antígeno en el test IFI valorado, podría tener en los títulos obtenidos tanto con sueros positivos como negativos, se determinó probando cuatro suspensiones larvarias de diferente ríqueza. Una que permitía la presencia de 3 larvas por 25 μ l de suspensión, otra en la que había 6 larvas por 25 μ l, una tercera con 9 larvas/25 μ l y la cuarta con 12 larvas/25 μ l.

Los títulos obtenidos con sueros positivos anti-triquina, anti-F.hepatica, anti-A.suum, anti-T.gondii y anti-T.pallidum, frente a cada una de las cuatro suspensiones antigénicas quedan reflejados en el cuadro nº 2.

De él se desprende como a medida que la concentración antigénica aumenta, los títulos de los sueros positivos anti-T.spiralis van disminuyendo, con lo que la sensibilidad de la técnica disminuye. Por contra, este aumento de concentración en la suspensión antigénica no parece tener gran influencia respecto a los títulos obtenidos con los restantes sueros, por lo que la especificidad del test no parece verse afectado.

Esto nos ha conducido a considerar como concentración antigénica óptima para nuestro test aquella suspensión larvaria capaz de proporcionar 9 larvas por 25 μ l de suspensión, puesto que los títulos conseguidos con los sueros positivos son constantes y similares a los obtenidos con concentraciones de 3 y 6 larvas por 25 μ l de suspensión,

con la ventaja de que los resultados ofrecidos por la suspensión de 9 larvas por 25 μ l son más constantes y reproducibles que en los otros casos.

=====

CUADRO 2 : INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ANTIGENO SOBRE
 LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TEST IFI PARA SERODIAGNOSTI
 CO DE T.SPIRALIS.

Nº: número de larvas/pocillo; T.s: suero anti-T.spiralis ;

A.s: suero anti-A.suum ; F.h: suero anti-F.hepatica ;

T.g: suero anti-T.gondii ; T.p: suero anti-T.pallidum.

=====

<u>Nº</u>	<u>D</u>	<u>T.s</u>	<u>F.h</u>	<u>A.s</u>	<u>T.g</u>	<u>T.p</u>
3*	1	128	4	16	4	4
	2	128	4	4	2	4
6*	1	128	4	4	2	4
	2	128	4	4	1	2
9	1	64	4	4	2	2
	2	64	4	2	1	1
12	1	64	4	2	1	1
	2	32	2	2	2	1

=====

* El desprendimiento de algunas larvas impidió la valoración
 de algunos títulos intermedios.

V.3.- INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON EL TEST DE IFI PARA SERODIAGNOSTICO DE TRIQUINELOSIS.

Se han probado tres formas de preparación y conservación de las larvas de T.spiralis utilizadas como antígeno en el test IFI, a fin de determinar si el estado físico del propio antígeno afecta los resultados obtenidos con los diferentes sueros positivos y negativos. En este sentido, se han utilizado portas con antígeno constituido por larvas completas de triquina fijadas a los mismos inmediatamente después de su purificación ; portas con antígeno constituido por larvas conservadas por congelación a -20°C . durante treinta días y portas preparados con larvas sometida a proceso de sonicación.

Los títulos máximos obtenidos para cada uno de los sueros ensayados y bajo cada una de las condiciones antes indicadas se reflejan en los cuadros nº 3,4 y 5.

=====
 CUADRO 3 : COMPORTAMIENTO DEL TEST DE IFI PARA SERODIAGNOSTICO
 DE T.SPIRALIS FRENTE A SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS.

(I) ANTIGENO CONSTITUIDO POR LARVAS COMPLETAS.

R: experiencia nº ... ; D: duplicado. ; T.s: suero anti-T.spiralis. ; F.h: suero anti-F.hepatica. ; A.s: suero anti-A.suum. ;
 T.g: suero anti-T.gondii. ; T.p: suero anti-T.pallidum.
 S.c.n.i.: suero de conejo no inmune; *: títulos obtenidos.

=====
 =====

<u>R</u>	<u>D</u>	<u>T.s</u>	<u>F.h</u>	<u>A.s</u>	<u>T.g</u>	<u>T.p</u>	<u>S.c.n.i</u>
1	1	256*	8	16	4	4	4
	2	512	4	8	1	2	2
2	1	256	4	4	2	1	2
	2	256	2	4	2	2	2
3	1	512	8	16	4	4	2
	2	256	16	16	4	4	2
4	1	256	4	16	1	2	2
	2	128	4	8	1	1	1

=====
 =====

=====

CUADRO 4 : COMPORTAMIENTO DEL TEST DE IFI PARA SERODIAGNOSTICO DE T.SPIRALIS FRENTE A SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS.

(II) ANTIGENO CONSTITUIDO POR LARVAS ENTERAS Y CONGELADAS DURANTE 30 DIAS.

R: experiencia n° ... ; D: duplicado. ; T.s: suero anti-T.spiralis. ; F.h: suero anti-F.hepatica. ; A.s: suero anti-A.suum. ; T.g: suero anti-T.gondii. ; T.p: suero anti-T.pallidum. ; S.c.n.i.: suero de conejo no inmune. ; *títulos obtenidos.

=====

<u>R</u>	<u>D</u>	<u>T.s</u>	<u>F.h</u>	<u>A.s</u>	<u>T.g</u>	<u>T.p</u>	<u>S.c.n.i.</u>
1	1	128*	4	8	2	2	2
	2	128	4	4	2	2	2
2	1	256	4	16	2	2	2
	2	256	4	8	2	2	2
3	1	128	4	8	1	4	1
	2	128	2	4	1	2	1
4	1	512	2	8	2	2	1
	2	256	2	8	2	1	1

=====

=====

CUADRO 5 : COMPORTAMIENTO DEL TEST DE IFI PARA SERODIAGNOSTICO
 DE T.SPIRALIS FRENTE A SUEROS POSITIVOS Y NEGATIVOS.
 (III) ANTIGENO CONSTITUIDO POR LARVAS SONICADAS.

R: experiencia nº ... ; D: duplicado. ; T.s: suero anti-T.spi-
 ralis. ; F.h: suero anti-T.hepatica. ; A.s: suero anti-A.suum.
 T.g: suero anti-T.gondii. ; T.p: suero anti-T.pallidum. ;
 S.c.n.i.: suero de conejo no inmune. ; *títulos obtenidos.

=====

<u>R</u>	<u>D</u>	<u>T.s</u>	<u>F.h</u>	<u>A.s</u>	<u>T.g</u>	<u>T.p</u>	<u>S.c.n.i.</u>
1	1	512	16	16	4	4	2
	2	512	8	16	2	4	2
2	1	256	8	16	2	2	4
	2	256	8	16	4	4	2
3	1	256	8	8	2	4	2
	2	128	4	4	2	4	1
4	1	128	4	8	4	4	2
	2	128	4	4	2	2	2

=====

Para determinar la influencia del estado del antígeno sobre los resultados obtenidos con el test IFI, se ha procedido al cálculo de la desviación standard y del intervalo de confianza de la media de todos los títulos obtenidos, para cada tipo de suero y tipo de antígeno, con cuatro réplicas y dos duplicados en cada caso, es decir; tratamientos: 3 ; sueros problema: 6 ; réplicas: 4 y duplicados: 2. A partir de estos datos se puede determinar la influencia que el tratamiento del antígeno tiene en la precisión del método. Los cálculos individualizados para cada suero problema quedan recogidos en los cuadros: 6,7,8,9,10, y 11.

Respecto al intervalo de confianza calculado y expresado en los mencionados cuadros, debe hacerse constar que ha sido transformado en cada caso en unidades o fracciones de dilución, lo que se indica en los cuadros como \pm x dil. situado a la derecha de los valores reales de las medias. Esto obedece a que en el método utilizado la cuantificación de los resultados no puede hacerse de forma continua, pues se trata de un método de doble dilución, por lo que las diferencias numéricas entre dos títulos, por ejemplo 512 y 256, no reflejan una diferencia real de 256 unidades, sino lo que indica es una diferencia en una dilución entre ambos sueros. Por otra parte, en este tipo de técnicas es admitido que cuando dos valores conseguidos en ellas se diferencian en una sola dilución hay que considerar ambos resultados iguales; por tanto, un título 256 será equivalente a otro de 512. En este sentido, como con el cálculo de la precisión se pretende demostrar si los resultados reales se encuentran muy dispersos o muy agrupados alrededor de la media, en nuestro caso un intervalo de \pm una dilución respecto a la media ha sido interpretado como aceptable y significativo de que los resultados están bien agrupados alrededor de la media y, en definitiva, la precisión del método en

esas condiciones es buena.

Analizando los valores calculados bajo las circunstancias antes indicadas, del cuadro Nº 6 se desprende que frente a suero de T.spiralis el antígeno constituido por larvas completas y fijadas aún vivas al porta dá al método una alta precisión, precisión que disminuye cuando el antígeno es congelado y cuando es sometido a sonicación; en cualquier caso la precisión del método con los tres antígenos probados es aceptable, pues en ningun momento el intervalo llega a alcanzar el valor de dos diluciones.

Frente a los demás sueros problemas, en general, el tratamiento del antígeno no modifica la precisión del método que, por otra parte, es en casi todos los casos más que aceptable puesto que el intervalo de la media se encuentra en ellos entre $\pm 0,4$ dilución y $\pm 1,1$ dilución. Tan solo en el caso de larvas completas--suero anti-F.hepatica este intervalo es más alto, $\pm 1,7$ diluciones; aunque nunca este intervalo alcanza el valor ± 2 diluciones.

En conclusión la congelación y sonicación de las larvas de T.spiralis utilizadas como antígeno en el test IFI para serodiagnóstico de triquinelosis no modifica la precisión que el método tiene, en comparación con la que presenta cuando se utilizan como antígeno larvas completas y recién purificadas.

=====

CUADRO 6: INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.

L.c.: antígeno constituidos por larvas completas; L.cong.: antígeno constituido por larvas congeladas; L.s.: antígeno constituido por larvas sonicadas. T.s: sueros positivos a *T.spiralis*.

=====

R	D	T.s.		
		L.c.	L.cong.	L.s.
1	1	256	128	512
	2	512	128	512
2	1	256	256	256
	2	256	256	256
3	1	512	128	256
	2	256	128	128
4	1	256	512	128
	2	128	256	128

=====

\bar{X}	304,0 \pm 0,8dil	224,0 \pm 1,25dil	272,0 \pm 1,22dil
S	127,0	124,0	144,0
D	88,9	85,9	99,7

=====

CUADRO 7: INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.

L.c.: antígeno constituido por larvas completas; L.cong.: antígenos constituidos por larvas congeladas; L.s.: larvas sonicadas; T.p: suero(+) a F.hepatica, D: dilución; Réplica; Duplidados.

=====

F.p				
R	D	L.c.	L.cong.	L.s.
1	1	8	4	16
	2	4	4	8
2	1	4	4	8
	2	2	4	8
3	1	8	4	8
	2	16	2	4
4	1	4	2	4
	2	4	2	4

=====

\bar{X}	6,3±1,7dil	3,3±0,76dil	7,5±1,1dil
S	4,2	1,0	3,8
D	2,9	0.7	2,6

=====
 CUADRO 8: INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.
 =====

L.c.: antígeno constituido por larvas completas; L.cong.: antígeno constituido por larvas congeladas; L.s.: larvas sonicadas; T.s.: sueros positivos; Dil.: dilución; Réplica; Duplicados. A.s: A.suum.

=====

<u>R</u>	<u>D</u>	<u>L.c.</u>	<u>L.cong.</u>	<u>L.s.</u>
1	1	16	8	16
	2	8	4	16
2	1	4	16	16
	2	4	16	16
3	1	16	8	8
	2	16	4	4
4	1	16	8	8
	2	8	8	4

=====

\bar{X}	11 ± 0,84dil.	8 ± 0,78dil.	11 ± 0,84dil.
S	5,2	3,5	5,2
D	3,6	2,4	3,6

=====

CUADRO 9: INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.

L.c.: atígeno constituido por larvas completas; L.cong.: atígeno constituido por larvas congeladas; L.s.: larvas sonica - das; T.s.: sueros positivos; Dil.: dilución; Réplica; Duplica dos. T.g: Tgondii

=====

R	T.g			
	D	L.c	L.cong.	L.s.
1	1	4	2	4
	2	1	2	2
2	1	2	2	2
	2	2	2	4
3	1	4	1	2
	2	4	1	2
4	1	1	2	4
	2	1	2	2

=====

\bar{X}	1,8±0,4dil	2,4±1,1dil	2,8±0,7dil
S	0,4	1,3	1,0
D	0,3	0,9	0,7

=====

CUADRO 10. INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.

L.c.: antígeno constituido por larvas completas; L.cong.: antígeno constituido por larvas congeladas; L.s.: larvas sonificadas; T.s.: sueros positivos; Dil.: dilución; Réplica; Duplicados. T.p: *T. pallidum*

=====

R	D	T.p		
		L.c.	L.cong.	L.s.
1	1	4	2	4
	2	2	2	4
2	1	1	2	2
	2	2	2	4
3	1	4	4	4
	2	4	2	4
4	1	2	2	4
	2	1	1	2

=====

\bar{X}		$2,5 \pm 1 \text{dil}$	$2,1 \pm 0,8 \text{dil}$	$3,5 \pm 0,4 \text{dil}$
S		1,2	0,8	0,9
D		0,8	0,6	0,6

=====

CUADRO 11 INFLUENCIA DEL ESTADO DEL ANTIGENO SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TEST DE IFI.

L.c. antígeno constituido por larvas completas; L.cong.: antígeno constituido por larvas congeladas; L.s.: larvas sonicadas; T.s. sueros positivos; Dil.: dilución; Réplica; Duplicados. Soni:sue-ro de conejo no inmune

=====

R	D	S.c.n.i.		
		L.c.	L.cong.	L.s.
1	1	4	2	2
	2	2	2	2
2	1	2	2	4
	2	2	2	2
3	1	2	1	2
	2	2	1	1
4	1	2	1	2
	2	1	1	2

=====

\bar{X}	2,1±0,8dil	1,5±0,5dil	2,1±0,8dil
S	0,8	0,5	0,8
D	0,6	0,3	0,6

Si bien el tratamiento del antígeno no parece modificar la precisión del test, resulta importante también determinar si la sensibilidad del mismo se ve o no afectada por el mencionado tratamiento por congelación y sonicación.

Para ello, y utilizando únicamente los resultados obtenidos con el suero positivo anti-T.spiralis, se ha procedido a calcular si entre las medias de los títulos con cada antígeno existen o no diferencias significativas. Para ello se ha aplicado la "t" de Student entre medias, reflejándose en los cuadros 12, 13, y 14 los resultados de los cálculos efectuados, siempre sobre transformaciones logarítmicas de los valores reales.

Los cálculos reflejan que a un nivel de significación del 0,05 no existen diferencias significativas entre las medias obtenidas con larvas completas y larvas sonicadas, siendo estas diferencias altamente significativas entre larvas completas y larvas congeladas, por una parte, y entre larvas congeladas y larvas sonicadas, por otra. Es decir, las medias de los títulos obtenidos para los sueros anti-T.spiralis con larvas completas y larvas sonicadas como antígeno son los más altos e iguales entre sí, mientras que la media cuando se emplean larvas congeladas es menor y significativamente diferente que en los otros dos casos.

En conclusión, la sonicación no altera la sensibilidad que el test IFI para serodiagnóstico de triquinosis presenta utilizando larvas completas y recientemente purificadas, mientras que la congelación del antígeno a -20°C durante 30 días sí disminuye significativamente la sensibilidad del método.

CUADRO 12: CALCULO DE LA t DE STUDENT ENTRE LAS MEDIAS DE LOS TITULOS CONSEGUIDOS EN EL TEST IFI CON SUEROS POSITIVOS ANTI-T.SPIRALIS UTILIZANDO TRES TIPOS DE ANTIGENOS: VALORES REALES TRANSFORMADOS LOGARITMICAMENTE.

L.c: antígenos de larvas completas de T.spiralis. L.cong.: antígenos de larvas de T.spiralis completas y congeladas a -20°C, 30 días; L.s.: antígenos de larvas sonicadas de T.spiralis. I. Comparación entre L.c y L.cong.

Nº Suero	L.c.		L.cong.	
	x1	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$	x2	$(x_2 - \bar{x}_2)^2$
1	2,40	0,0016	2,11	0,0361
2	2,71	0,0729	2,11	0,0361
3	2,40	0,0016	2,40	0,0100
4	2,40	0,0016	2,40	0,0100
5	2,71	0,0729	2,11	0,0361
6	2,40	0,0016	2,11	0,0361
7	2,40	0,0016	2,71	0,1681
8	2,11	0,1089	2,40	0,0100

$\sum x$ 19,53 18,35

\bar{x} 2,44 2,30

$\sum (x - \bar{x})^2$ 0,2611 0,3425

$$S^2 = \frac{0,2611 + 0,3425}{14} = 0,2855$$

$$E = \sqrt{\frac{0,2855 \cdot 16}{64}} = 0,2671$$

$$t = \frac{2,44 - 2,2,30}{0,2671} = 6,21$$

t(0,05-14gl) = 1,761

CUADRO 13: CALCULO DE LA t DE STUDENT ENTRE LAS MEDIAS DE LOS TITULOS CONSEGUIDOS EN EL TEST IFI CON SUEROS POSITIVOS ANTI-T.SPIRALIS UTILIZANDO TRES TIPOS DE ANTIGENOS: VALORES REALES TRANSFORMADOS LOGARITMICAMENTE.

L.c: antígenos de larvas completas de T.spiralis. ; L.cong.: antígenos de larvas de larvas de T.spiralis completas y congeladas a -20°C, 30 días, L.s: antígenos de larvas sonicadas de T.spiralis.II. Comparación entre L.c y L.s.

Nº Suero	L.c		L.s	
	x_1	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$	x_3	$(x_3 - \bar{x}_3)^2$
1	2,40	0,0016	2,70	0,1225
2	2,71	0,0729	2,70	0,1225
3	2,40	0,0016	2,40	0,0016
4	2,40	0,0016	2,40	0,0016
5	2,71	0,0729	2,40	0,0016
6	2,40	0,0016	2,10	0,0676
7	2,40	0,0016	2,10	0,0676
8	2,11	0,1089	2,10	0,0676
<hr/>				
$\sum x$	19,53		18,93	
\bar{x}	2,44		2,36	
$\sum (x - \bar{x})^2$	0,2600		0,4526	

$$s^2 = \frac{0,2611 + 0,4526}{14} = 0,2934$$

$$E. = \sqrt{\frac{0,2934 \times 16}{64}} = 0,2708$$

$$t. = \frac{2,44 - 2,36}{0,2708} = 0,29$$

$$t(0,05-14gl) = 1,761$$

CUADRO 14: CALCULO DE LA t DE STUDENT ENTRE LAS MEDIAS DE LOS TITULOS CON SEGUIDOS EN EL TEST IFI CON SUEROS POSITIVOS ANTI-T.SPIRALIS UTILIZANDO TRES TIPOS DE ANTIGENOS : VALORES REALES TRANSFORMADOS LOGARITMICAMENTE.

L.c: antígenos de larvas completas de T.spiralis , L.cong: antígenos de larvas de T.spiralis completas y congeladas a -20°C,30 días; L.s: antígenos de larvas sonicadas de T.spiralis.III.Comparación entre L.cong. y L.s.

Nº Suero	L.c.		L.s.	
	x_2	$(x_2-x_2)^2$	x_3	$(x_3-x_3)^2$
1	2,11	0,0361	2,70	0,1225
2	2,11	0,0361	2,70	0,1225
3	2,40	0,0100	2,40	0,0016
4	2,40	0,0100	2,40	0,0016
5	2,11	0,3610	2,40	0,0016
6	2,11	0,0361	2,10	0,0676
7	2,71	0,1681	2,10	0,0676
8	2,40	0,0100	2,10	0,0676
Σx	18,35			18,93
\bar{x}	2,30			2,36
$\Sigma (x-x)^2$	0,3425			0,4526

$$s^2 = \frac{0,3425+0,4526}{14} = 0,3748$$

$$E = \sqrt{\frac{0,3748 \cdot 16}{64}} = 0,3061$$

$$t = \frac{2,30 - 2,36}{0,3061} = 5,40$$

$$t(0,05-14gl) = 1,761$$

V.4.- VALORACION DEL TEST DE IFI PARA SERODIAGNOSTICO DE TRIQUINE-
LOSIS: PRECISION, SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.

Como se indicó en el epigrafe IV.2.6. del Material y Métodos, la valoración global de cualquier test inmunológico viene establecida por tres parámetros: precisión, sensibilidad y especificidad. En nuestro estudio se han valorado estos parámetros a partir de los datos obtenidos en la titulación de los sueros positivos frente a distintos antígenos, ya enumerados repetidamente a lo largo de esta Memoria, utilizando como antígeno larvas de triquina completas, vivas y fijadas al porta a razón de 9 larvas por pocillo. Los resultados de los títulos obtenidos en cada caso se reflejan en cuadro nº 3. que recoge los títulos máximos conseguidos con cada suero.

V.4.1.- PRECISION.

Títulos obtenidos en el test IFI con sueros de conejo anti-T.spiralis. Resultados de cuatro réplicas con dos duplicados.

R	D	Títulos
1	1	256
	2	512
2	1	256
	2	256
3	1	512
	2	256
4	1	256
	2	128
\bar{x}		304,0 \pm 0,08
S		127,00
D		88,9

En este epígrafe se confirma lo ya visto anteriormente, al comprobar la influencia que el tratamiento del antígeno tiene sobre los títulos de los sueros en el test IFI utilizando larvas completas recientemente purificadas como antígeno. El test presenta un alto grado de precisión puesto que el intervalo de la media, reflejado en unidades o fracciones de unidades de dilución, es en este caso inferior a ± 1 dilución, por lo que los resultados individuales están muy agrupados alrededor de la media y la precisión del método es adecuada.

V.4.2.- SENSIBILIDAD

Para la determinación de la sensibilidad del test IFI valorado en este trabajo, se han considerado como sueros verdaderamente positivos los obtenidos a partir de conejos inmunizados con antígeno de T.spiralis y como verdaderos negativos los restantes sueros que, a su vez, son positivos frente a F.hepatica, A.suum, T.gondii, T.pallidum o procedentes de conejos sanos.

El cálculo del índice de sensibilidad, se ha realizado de acuerdo con la fórmula indicada en IV.2.6. de Material y Métodos, y a partir de los resultados reales de las titulaciones de los sueros reflejados en los cuadros de Resultados nº 15, 16, 17, y 18 de acuerdo con los siguientes planteamientos:

1.- Sensibilidad del método para títulos iguales a 256:

Resultado de la prueba	<u>Estado real de las muestras</u>	
	positivo	
positivo	7	
negativo	1	

Efectuando los cálculos correspondientes tenemos que:

IS: 85,71

2.- Sensibilidad del método para título igual o inferior a 128:

Resultado de la prueba	<u>Estado real de las muestras</u>	
	positivo	
positivo	8	
negativo	0	

Efectuando los cálculos correspondientes tenemos

=====
 CUADRO 15: TITULOS OBTENIDOS MEDIANTE EL TEST IFI PARA TRIQUINELOSIS
 CON SUEROS ANTI-T.SPIRALIS (T.s.), ANTI-F.HEPATICA (F.h.); ANTI-A.
SUUM (A.s.); ANTI-T.GONDII (T.g.); ANTI-T.PALLIDUM (T.p.); Y SUE-
 RO DE CONEJO NO INMUNE (S.c.n.i.).

Antígeno utilizado: larvas de triquina vivas y completas. R₁: pri-
 mera réplica. D: duplicados.

=====
 =====

D		TITULOS									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
T.s.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F.h.	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A.s.	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T.g.	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.p.	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Scni.	1	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

=====
 =====

CUADRO 16: TITULOS OBTENIDOS MEDIANTE EL TEST IFI PARA TRIQUINELO-
 SIS CON SUEROS ANTI-T.SPIRALIS (T.s.); ANTI-F.HEPATICIA (F.h.);
 ANTI-A.SUUM (A.s.); ANTI-T.GONDII (T.g.); ANTI-T.PALLIDUM (T.p.);
 Y SUERO DE CONEJO NO INMUNE (S.c.n.i.).

Antígeno utilizado: larvas de triquina vivas y completas. R₂: se-
 gunda réplica. D: duplicados.

	D	TITULOS									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
T.s.	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F.h.	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A.s.	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T.g.	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T.p.	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Scni.	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

=====
 CUADRO 17 : TITULOS OBTENIDOS MEDIANTE EL TEST IFI PARA TRIQUINELOSIS
 CON SUEROS ANTI-T.SPIRALIS (T.s) ; ANTI-F.HEPATICA (F.h) ; ANTI-
 A.SUUM (A.s) ; ANTI-T.GONDII (T.G) ; ANTI-T.PALLIDUM (T.p) ;
 Y SUERO DE CONEJO NO INMUNE (Seni).
 Antígeno utilizado: larvass de triquina vivas y completas. R₃: cuar-
 ta réplica. D: duplicado..
 =====

D		TITULOS									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
T.s	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F.h	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
A.s	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
T.g	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T.p	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Seni	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

=====

=====

CUADRO 18: TITULOS OBTENIDOS MEDIANTE EL TEST IFI PARA TRIQUINELOSIS
 CON SUEROS ANTI-T.SPIRALIS (T.s) ; ANTI-F.HEPATICA (F.h) ; ANTI-
 A.SUUM (A.s) ; ANTI-T.GONDII (T.g.) ; ANTI-T.PALLIDUM (T.p) ;
 Y SUERO DE CONEJO NO INMUNE (Scni)

Antígeno utilizado: larvas de triquina vivas y completas. R₄: ter-
 cera réplica. D: duplicados.

=====

D		TITULOS									
		1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
T.s	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
F.h	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
A.s	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
T.g	1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.p	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Scni	1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

=====

que:

IS: 100

De los cálculos realizados se desprende que fijando el título diagnóstico para el test IFI en 256, la sensibilidad del mismo sería del 85,7 % ; mientras que fijándose en 128 o inferior la sensibilidad sería del 100 %.

V.4.3.- ESPECIFICIDAD

A fin de determinar la especificidad del test frente a sueros positivos contra T.spiralis y, al mismo tiempo determinar las posibles reacciones cruzadas que éste presenta con sueros inmunes a otros antígenos, a partir de los datos reflejados en los cuadros de resultados números 15,16,17y18, y de la fórmula reflejada en el apartado IV.2.6., se han realizado estudios comparativos individualizados entre sueros positivos a T.spiralis y sueros positivos frente a otros antígenos. Tal como se refleja más abajo:

1.- Índice de especificidad frente a sueros positivos a F.hepatica.

a) Diluciones de sueros a 1/8:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo T.s	negativo
positivo	8	3
negativo	0	5

$$I.E. = \frac{5-3}{5} \times 100. = 40$$

b) Diluciones de sueros a 1/16:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo T.s	negativo
positivo	8	0
negativo	0	8

Por tanto el índice de especificidad es:

$$I.E. = \frac{8-0}{8} \times 100 = 100$$

2.- Índice de especificidad frente a sueros positivos a A.suum.

a) Diluciones de sueros a 1/16:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo T.s	negativo
positivo	8	3
negativo	0	5

Siendo el índice de especificidad:

$$I.E. = \frac{5-3}{5} \times 100 = 40$$

b) Diluciones de sueros a 1/32:

Resultado de la prueba	Estado real de la muestra	
	positivo T.s	negativo
positivo	8	0
negativo	0	8

Así, el índice de especificidad es:

$$I.E. = \frac{8-0}{8} \times 100 = 100$$

3.- Índice de especificidad frente a sueros positivos a T.gondii.

a) Diluciones de sueros a 1/4:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo T.s	negativo
positivo	8	3
negativo	0	5

Siendo el índice de especificidad:

$$I.E. = \frac{5-3}{5} \times 100 = 40$$

b) Diluciones de sueros a 1/8:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo	negativo
	T.s	
positivo	8	0
negativo	0	8

$$I.E. = \frac{8-0}{0} \times 100 = 100$$

3.- Índice de especificidad frente a sueros positivos a T.pallidum.

a) Diluciones de sueros a 1/4:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo	negativo
	T.s	
positivo	8	2
negativo	0	6

$$I.E. = \frac{6-2}{6} \times 100 = 67$$

b) Diluciones de sueros a 1/8:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo	negativo
	T.s	
positivo	8	0
negativo	0	8

$$I.E. = \frac{8-0}{8} \times 100 = 100$$

4.- Índice de especificidad frente a sueros positivos a suero inmune de conejo.

a) Diluciones de sueros a 1/4:

Resultado de la prueba	Estado real de la muestra	
	positivo	negativo
	T.s	
positivo	8	1
negativo	0	7

Siendo el índice de especificidad:

$$\text{I.E.} = \frac{7-1}{7} \times 100 = 86$$

b) Diluciones de sueros a 1/8:

Resultado de la prueba.	Estado real de la muestra	
	positivo	negativo
	T.s	
positivo	8	0
negativo	0	8

$$\text{I.E.} = \frac{8-0}{8} \times 100 = 100$$

Del análisis de estos cálculos se desprende que para que no se produzcan reacciones cruzadas en esta técnica con sueros positivos a F.hepatica, el título diagnóstico o significativo habría que fijarlo en 16. Este título para evitar falsos positivos con sueros de individuos sensibilizados frente a A.suum debe ser de 32. Finalmente, para que no se produzcan este tipo de interferencias con sueros de pacientes afectados de toxoplasmosis o sífilis el título del test IFI para serodiagnóstico de triquinelosis habría que fijarlo en 8.

De todo lo expuesto se deduce que si este título se fija en 32 no deberían producirse falsos positivos, al menos frente a sueros positivos a los distintos antígenos ensayados. Como, por otra parte, la sensibilidad del método es de 100 a diluciones 128, si se fija como título significativo para interpretar los resultados de este test el de 32, podríamos obtener un índice de especificidad 100 y un índice de sensibilidad 100, mientras que si se fijase en 16 el índice de especificidad, al menos frente a sueros positivos a A.suum, descendería a 40.

Por todo ello, concluimos que en nuestras condiciones de trabajo, el título significativo para el test IFI ensayado y valorado debe ser 32. Lo que coincide con lo determinado por Chorrera y col., 1976 (14), quienes consideran, en sus condiciones de trabajo como significativo un título de 40 y como dudoso el de 20 y difiere legeramente de lo indicado por Bozenna y col., 1975 (7), para quienes el título significativo estaría en 50.

V.5.- ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO EN POBLACION HUMANA MEDIANTE EL TEST DE IFI.

Como se indicó en la justificación del trabajo, el segundo objetivo planteado en él, tras la puesta en marcha y valoración del test IFI para triquinelosis, era su aplicación a un estudio epidemiológico entre población potencialmente sana, a fin de determinar el mayor o menor grado de prevalencia de la triquinelosis entre la población humana de Sevilla y zonas próximas.

De acuerdo con lo expresado en el apartado IV.2.7. del Material y Métodos, para cumplir este objetivo se planificó una toma de muestras utilizando cuatro fuentes: los donantes de sangre voluntarios de la Cruz Roja de Sevilla, población sometida a control sanitario periódico en el Laboratorio Municipal de Sevilla y población femenina de la zona rural de la Sierra de Huelva, población considerada, en principio, como potencialmente sana. Así mismo, se recogieron muestras entre paciente encamados en la Ciudad Sanitaria Virgen del Rocío de Sevilla, grupo considerados como enfermos a efectos de nuestro estudio.

CUADRO 19: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE LA TRIQUINELOSIS, SOBRE POBLACION HUMANA.

II. Distribución en función del habitat.

Nº: número de sueros estudiados. ; Nº (+): número de positivos. ; Nº (-): número de negativos. ; 1/8, 1/16, 1/32, : diluciones de suero.

HABITAT	Nº	Nº(+)			Nº(-)			%(+)			
		1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32	
RURAL											
HUELVA-1	96	36	19	10	60	77	86	37,50	19,79	10,41	
OTROS -2	93	20	7	3	73	86	90	21,50	7,52	3,32	
URBANO =3	139	29	11	6	110	128	134	20,86	7,91	4,31	

CUADRO 20: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE LA TRIQUINELOSIS, SOBRE POBLACION HUMANA.

III. Distribución en función del estado de salud.

Nº: número de sueros estudiados. ; Nº (+): número de positivos. ; Nº (-): número de negativos. ; 1/8, 1/16, 1/32, ; diluciones de suero. ; S: estado de salud.

S	Nº	Nº (+)			Nº (-)			% (+)		
		1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32
SANOS -1	275	63	31	18	212	244	257	22,90	11,27	6,54
ENFERMOS -2	53	22	6	1	31	47	52	41,50	11,32	1,86

CUADRO 21: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE LA TRIQUINELOSIS
 SOBRE POBLACION HUMANA.

I. Distribución en función del sexo.

Nº: número de sueros estudiados. ; Nº (+): número de positivos. ; Nº (-): número de negativos. ; 1/8 , 1/16, 1/32, : diluciones de suero.

SEXO	Nº	Nº (+)			Nº (-)			% (+)		
		1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32
VARON-1	176	35	13	7	141	163	169	19,88	7,38	3,97
HEMBRA-2	152	50	24	12	102	128	140	32,89	15,78	7,89

CUADRO 22: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO SEROEPIDEMIOLOGICO DE LA TRIQUINELOSIS SOBRE POBLACION HUMANA.

IV. Distribución por grupos de edades.

Nº: número de sueros estudiados. ; Nº (+): número de positivos. ; Nº (-): número de negativos. ; 1/8, 1/16, 1/32, : diluciones de suero. ; E: grupos de edades.

E	Nº	Nº(+)			Nº(-)			%(+)		
		1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32	1/8	1/16	1/32
11-22-1	55	11	5	4	44	50	51	20,00	9,09	7,27
21-30-2	123	35	16	7	88	107	116	28,40	13,00	5,69
31-40-3	47	13	5	5	34	42	42	27,65	10,63	10,63
41-50-4	31	3	2	1	28	29	30	9,67	6,45	3,22
51-60-5	27	7	5	0	20	22	27	25,90	18,51	0
61-70-6	25	7	2	1	18	23	24	28,00	8,00	4,00
71-80-7	14	7	2	1	7	12	13	50,00	14,28	7,14
80-- 8	6	2	0	0	4	6	6	33,33	0	0

En total se han valorado 328 sueros, 96 de la Sierra de Huelva, 53 del Hospital Virgen del Rocío, 50 de la Cruz Roja y el resto del Laboratorio Municipal.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en los cuadros 19,20,21 y 22, considerándose los positivos y negativos de cada grupo en función de tres diluciones o títulos diferentes: 8,16 y 32.

La valoración de los resultados y el cálculo de diferencias estadísticas entre los distintos grupos se ha realizado mediante ordenador personal por el estadístico t y con un nivel de confianza del 0,05 o de 0,01 según los casos.

Los resultados se han agrupado para su comparación en función de cuatro circunstancias:

- Habitat del donante, rural o urbano y dentro del rural los procedentes de la Sierra de Huelva y los procedentes de otras zonas rurales.
- Estado clínico inicial del donante: sano o enfermo.
- Sexo del donante: varón y hembra.
- Edad del donante: 11-22, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, y más de 80 años.

Respecto a la importancia del habitat o procedencia de los donantes en el mayor o menor índice de parasitación (cuadro nº 19), los cálculos efectuados indican que, tomando como título significativo 32, la presencia de triquinelosis es significativamente más alta (nivel del 0.05) entre la población femenina de la Sierra de Huelva que entre el resto de población de origen rural o urbano, y, por otra parte, no existen diferencias significativa entre

los procedentes de la Sierra de Huelva y los de origen urbano, ni entre los de origen rural distintos al de la Sierra de Huelva y los de origen rural.

En líneas generales, la no existencia de diferencia entre la triquinelosis urbana y rural coincide con lo hallado en Granada por Gómez García y col., 1978 (20) quienes encontraron para población rural y urbana índices de parasitación del 2,49 % y del 2,14 % respectivamente. Porcentajes próximos aunque algo inferiores a los detectados para igual tipo de población en este trabajo, 3,32 % y 4,31 %.

De nuestros resultados destaca el que el porcentaje de positivos entre la población procedente de la Sierra de Huelva sea netamente más alto, 10,4 %, que en el resto y significativamente distinto.

La explicación podría encontrarse en las características de la población estudiada y de la zona considerada. En efecto todo este grupo de población está formada por mujeres y la Sierra de Huelva se caracteriza por la importancia que el ganado de cerdo y su industria derivada, en la que, así mismo, las matanzas domiciliarias más o menos clandestinas son frecuentes y en las que la mujer juega, por tradición, un papel importante, esto podría facilitar un mayor contacto de esta población femenina con carnes parasitadas y la explicación a la mayor prevalencia de la triquinelosis entre ella, circunstancias que normalmente no se dan, al menos de forma tan notable, en el ambiente urbano o en el ambiente rural distinto al señalado anteriormente.

En el cuadro nº 20 se reflejan los sueros humanos positivos y negativos a T.spiralis distribuidos en función del potencial estado clínico, sano o enfermo, de los donantes. Se han estudiado 275 sueros de donantes potencialmente sanos y 53 sueros de donantes enfermos por otras causas distintas a triquinelosis. Del grupo de sanos 18 sueros fueron positivos a títulos 32 o superiores mientras que entre el grupo de enfermos sólo 1 dió resultado positivo a título 32 o superiores. El análisis estadístico de estos resultados muestra que no existe diferencias significativas respecto a la incidencia de la triquinelosis entre los dos grupos de población considerado.

En este estudio seroepidemiológico se ha considerado también la posible influencia que el sexo de los donante pudiera tener sobre su mayor o menor receptividad al parasitismo por T.spiralis. En el cuadro nº 21 se indican los resultados obtenidos con los sueros de 176 donantes varones y 152 donantes hembras, de los primeros 7 fueron positivos a títulos de 32 o superiores mientras que 12 lo fueron en el segundo grupo. El estudio comparativo entre los porcentajes de positivos respectivos no muestra diferencias significativas entre ambos grupos de población, por lo que el sexo del hospedador no parece tener importancia o incidencia sobre el índice de parasitación por T.spiralis de la población humana, datos que coinciden con los obtenidos para idénticos parámetros por otros autores. En cualquier caso si comparamos los porcentajes de parasitación obtenidos en este estudio con el similar realizado en Granada por Gómez García y col., los aquí reflejados son más altos, 9,97 % para varones, 7,89 % para hembras.

Finalmente como consecuencia de los resultados obte-

nidos en este estudio seroepidemiológico "piloto" de la triquinosis humana en la zona de Sevilla y Huelva, se ha analizado la posible influencia de la edad del hospedador sobre sus niveles de parasitación. En el cuadro nº 22 se recogen distribuidos por grupos de edad el nº de sueros positivos con títulos iguales o superiores a 32. Los porcentajes de parasitación por grupo oscilan desde el 0 % para el grupo comprendido entre 51-60 años de edad y 10,63 % para el grupo de 31-40 años de edad. Los cálculos correspondientes muestran que no existen diferencias significativas entre los grupos de edad considerados, por lo que este factor no parece predisponer al hospedador humano a una mayor infectabilidad por T.spiralis.

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

- 1.- Por los resultados obtenidos con los distintos métodos de digestión ensayados a fin de obtener larvas vivas de T.spiralis, concluimos que el más adecuado es el de Marsh y Kent modificado aumentando el tiempo de digestión de 1 a 3 horas.
- 2.- El comportamiento del test IFI valorado en este trabajo varia en función de la concentración de antígeno utilizado, siendo, en nuestras condiciones de trabajo, la concentración adecuada la correspondiente a una suspensión de larvas que contenga 9 larvas por cada 25 de suspensión.
- 3.- De los resultados obtenidos podemos concluir que la congelación y sonicación de las larvas de triquina utilizadas como antígeno en el test de IFI, no alteran significativamente la precisión del mismo, comparada con la que presenta utilizando larvas completas y recientes.
- 4.- La congelación de las larvas de T.spiralis durante 30 días a -20°C utilizadas como antígeno disminuye significativamente la sensibilidad del test de IFI ensayado. Por el contrario la sonicación de estas larvas no afecta significativamente esta característica del método.
- 5.- El análisis de los resultados obtenidos utilizando como antígeno larvas completas y recientemente obtenidas muestra una alta precisión en el método IFI propuesto, al encontrarse los resultados individuales muy agrupados alrededor de la media.
- 6.- Los ensayos de sensibilidad y especificidad realizados en la valoración del test IFI propuesto para serodiagnóstico de triquinelosis, permiten llegar a la conclusión de que, en nuestras condiciones de trabajo, el título significativo ha de fi-

jarse en 32, con lo que se consiguen índices de sensibilidad y de especificidad muy altos.

- 7.- Los resultados obtenidos en el estudio epidemiológico "piloto" realizado sobre población humana, permiten determinar que entre la población femenina de la Sierra de Huelva la incidencia del parasitismo es significativamente más alta que entre los otros grupos de población, rural o urbana.
- 8.- No se detectan diferencias significativas en la incidencia de la triquinelosis humana entre población rural y urbana.
- 9.- El sexo del hospedador no parece tener influencia en su mayor o menor receptividad al parásito, T.spiralis, al menos en las condiciones en que esta encuesta "piloto" ha sido realizada. Igual ocurre respecto a la edad de la población.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Anderson, R.C. ; Bain, O. ; 1982
CIH keys to the Nematode Parasites of vertebrates, N° 9.
Editado por : Anderson, R.C. ; Chabaud, A.G. ; Willmott, S. Common-
wealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England, 26 pp.
2. Andrzejewska, I. ; Winiecka, J. 1978
A comparative studies of sera from patients, with trichinellosis
using immunofluorescent antibody test (IFAT), bentonite flocculation
test (BFT) and latex flocculation test (LFT).
Abstracts del IV Congreso Internacional de Parasitología.
Warsovia (Polonia), Sección E:100.
3. Bachman, G.W. 1928
A precipitin test in experimental trichiniasis.
Journal Preventive Medical, 2: 513-523
4. Baratawidjaja R.K. ; Hewson, A. ; Labzoffsky, N.A. ; 1963
Fluorescent antibody staining in the serodiagnosis of trichinosis.
Canadian Journal of Microbiology, 9: 625-628
5. Boron-Kaczmarek, A. ; Prokopowicz, D. ; Machnicka, B. ; 1978
Evaluation of immunocytoadherence test in the course of experimen-
tal trichinellosis in rabbits.
Abstracts del IV Congreso Internacional de Parasitología.
Warsovia (Polonia), Sección E:102
6. Bourns, T.K.R. 1952
The discovery of trichina cysts in the diaphragm of a six-week old
child.
Journal Parasitology, 38:367

7. Bozenna, J. ; Gancarz, Z. ; Kunstmanowa, H. ; 1975
Indirect haemagglutination and indirect immunofluorescence tests
in the diagnosis of human trichinellosis in an epidemic focus.
Wiadomosci Parazytologiczne, 21(4-5): 663-666
8. Bozicevich, J. ; Tobie, J.E. ; Thomas, E.H. ; Hoyden, H.M. ;
Wards, S.B. ; 1951
A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis.
Public Health Reports, 66:806-814
9. Brand, T.Von. ; Weinstein, P.P. ; Mehlman, B. ; 1952
Observations on the metabolism of Bacteria-free larvae of
T.spiralis.
Experimental Parasitology, 1:245-255
10. Carter, J.R. ; 1949
Plasma cell hyperplasia and hyperglobinemia in trichinosis.
Journal Pathology, 25:309-321
11. Cironeanu, I. ; 1971
Letter to the secretary of the International Commission on tri-
chinellosis.
Wiadomosci Parazytologiczne, 17:680
12. Cironeanu, I. ; Istrate, N. ; Iordache, I. 1981
Comparative results of ELISA and the larval microprecipitation
test (LMP) in experimental swine trichinellosis.
Trichinellosis. Editado por: Kim, C.W.; Ruitenberg, E.J. ;
Teppema, J.S. Reedbooks Ltd Fox Lane North, Chertsey, Surrey.
England. 391-394
13. Faust, A.B. ; Russell, M.D. ; Jung, B.S. ; Craig, 1979
Parasitología clínica. Editorial Salvat. 1ª edición, 2ª reimpre-
sión. Barcelona (1979).

14. Choreda, L. ; Jarczewska, K. ; Zeromski, I. ; 1976
Specific antibody levels in indirect IFT in patients with trichinosis history.
Abstracts de la IV Conferencia Internacional de Triquinelosis.
Poznan (Polonia), 58, 1976.
15. Despommier, D. ; Muller, M. ; Jenks, B. ; Rruitstone, M. ; 1974
Immunodiagnosis of human trichinosis using contraelectrophoresis and agar gel diffusion techniques.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 23:41-45
16. Durich, J. ; 1952
La triquinosis en la provincia de Valencia.
Revista de Sanidad e higiene pública, 26:47-53
17. Forrester, A.T.T. ; Nelson, G.S. ; Sander, G. ; 1961
The first record of an outbreak of trichinosis in Africa South of the Sahara.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med-Hyg. 55:503-513
18. Gancarz, S. ; Kepska. ; 1962
Clinical and epidemiological observations during and outbreak of trichinellosis in Zabrze.
Acta Parasitologica Polonica, 10:271-276
19. Goldberg, E. 1958
The glycolytic Pathway in Trichinella spiralis larvae.
Journal Parasitology, 44:363-370
20. Gomez Garcia, V. ; Rodriguez, M. ; Gonzalez, J. ; Mañas, I. 1974
Hallazgo de reacciones inespecíficas con la prueba de H.A.I. para triquinosis, en sueros humanos con distinto grado de PCR.
Revista Ibérica de Parasitología, 34(3-4):317-322
21. Gonzalez Castro, J. ; Fernandez Amela, T. ; Guevara Pozo, D. 1955
Primeros ensayos en España de la prueba de Sussenguth y Kline

para el diagnóstico de la triquinosis.

Revista Ibérica de Parasitology, 15:3-27

22. Gonzalez Castro, J. ; Fernandez Amela, F. ; Guevara Pozo, D. 1955
Comportamiento de la prueba de Suessenguth y Kline en sueros humanos y de animales afectados de diversas parasitosis.
Revista Ibérica de Parasitología. Volúmen extra: 1930.
23. Gonzalez Castro, J. ; Fernandez Amela, F. ; 1955
Nuevas aportaciones al estudio de la prueba de Sussenguth Kline.
Revista Ibérica de Parasitología, 15:243-257
24. Gonzalez Castro, J. ; Lizcaino Herrera, J. ; Martos, M.L. ; 1959
Comportamiento de la prueba de Suessenguth y Kline en cerdos sometidos a infestaciones triquinosas de diversos grados de intensidad.
Revista Ibérica de Parasitología, 19:25-68
25. Gonzalez Castro, J. ; Rodriguez Osorio, M. ; Perez Garro, M.C.
Gomez Garcia, V. ; 1972
Purificación de larvas de T.spiralis.
Revista Ibérica de Parasitología, 32(1-2):1-11
26. Gudiol, F. ; Fernandez-Viladrich, P. ; Fernandez-Nogues, F. 1974
Triquinosis. A propósito de 22 observaciones.
Medicina Clínica, 63:125-137
27. Guevara Pozo, D. ; 1981
La trichinellosis experimental en las investigaciones españolas.
Discurso leído en el acto de su recepción a la Academia de Ciencias Matemáticas, Fisico-Químicas y Naturales de Granada.
Granada 1981
28. Herrero Martin, J. ; Martin Calama, A. 1961
El problema de la triquinosis en la provincia de Cáceres. Resultados de una gran campaña de desratización en el medio rural.
Revista de Sanidad e Higiene Pública, 35:47-53

29. Hunt, G.R. 1967
T.spiralis in Dogs and cats.
Journal Parasitology, 53,659
30. Jackson, G.J. 1959
Fluorescent antibody studies of Trichinella spiralis infections
Journal Infection Disease,105,2:97-117
31. Kagan, I.G. ; Bargain, V. 1956
Studies on the serology of trichinosis with haemagglutination
agar diffusion test and precipiting ring test.
Journal of Parasitology, 42:237-245
32. Kagan, I.G. 1981
Recent reports on the serology of trichinosis.
Trichinellosis. Editado por: Kim, C.W. ; Ruitenberg, E.J. ; Teppema,J.S.
Reedbooks Ltd Fox Lane North, Chertrey, Surrey. England, 257-261
33. Kershaw, W.E. ; Hill, C.A. ; Semple, A.B. ; Meredith Davies, J.B,
1956
The distribution of the larvae of T.spiralis in the muscles
viscera and central nervous system in cases of trichinosis at
Liverpool in 1953, and the relation of the illness to the intensity
of infection.
Annals Tropical Medicine and Parasitology, 50:355-361
34. Kozar, Z. 1959
Problems of trichinellosis in Poland and plan of control of the
invasion.
Wiadomosce Parazytology, 5:280-291
35. kozar, Z. 1961
Some comments on the outbreak of trichinellosis in Mozina, pro-
vince of Poznan.
Wiadomosci Parazytology, 7:589-594

36. Kozar, Z. ; Kozar, M. 1963
The course of experimental trichinellosis in mice. Methods of infection and the influence of various invasive doses on the mortality and weight of the animals.
Wiadomosce Parazytology, 9:419-434
37. Kozar, Z. ; Kozar, M. 1968
Dynamics and persistence of antibodies in trichinellosis.
Wiadomosci Parazytologiczne, 2:171-185
38. Kramar, J. 1967
The fluorescent staining complement for the serodiagnosis of toxoplasmosis.
Folio Parasitol (Praha) 14:5-12
39. Labzoffsky, D.U. ; Baratawidjaja, M.D. ; Kuitunen, Ph. D. ; Lewis, M.D. ; Dakavelman, M.D. ; Morrissey, L.D. 1964
Immunofluorescence as an aid in the early diagnosis of trichinosis.
Canad. Med. Ass. J. 90:920-921
40. Larsh, J.E. ; Kent, D.E. 1949
The effect of alcohol on natural and acquired immunity of mice to infection with T.spiralis.
Journal Parasitology, 35:45-53
41. Lizcano Herrera, J. 1979
Estudio sobre la preferente localización de larva de T.spiralis (Owen 1835) en los músculos del cerdo (Sus Scrofa Domestica)
Revista Ibérica de Parasitología, 39:233-240
42. Luengo Miró 1953
La triquinosis ignorada en Madrid.
Revista Higiene Sanidad Pública, 17:448-468

43. Lukashenko, N.P. ; Brzesky, W.W. 1962
Trichinellosis in wild animals in Siberia, Arctic and Far East
USSR.
Wiadomosci Parazytologiczne, 8:589-597
44. Machnicka, B. 1977
The indirect rosette forming cells in the blood of rabbits in-
fected with T.spiralis.
Wiadomosci Parazytologiczne, 23(6):757-762
45. Martinez Marañon, R. ; Trejo, J. ; Aguirre, B. 1974
Frequency of infection by T.spiralis in 100 human diaphragms in
Mexico city.
Revista de Investigación en Salud Pública, 34(3):95-105
46. Martinez, F. ; Hernandez, S. ; Becerra. 1978
Epidemiology of trichinellosis in Córdoba (Spain).
Wiadomosci Parazytologiczne, 24(1): 24-27
47. Maus, E.A. 1940
The "in vitro" effect of immuniserum upon T.spiralis larvae.
American Journal of Hygiene Section D, 32:80-83
48. Maynard, J.E. ; Pauls, F.F. 1962
Trichinosis in Alaska. A review and report of observations on
serodiagnosis and skin testing.
American Journal Hygiene, 76:252-261
49. Milanovic, M. ; Popovic, R. ; Popovic, D. 1964
Epidemies de trichinose en Yugoslavie.
Wiadomosci Parazytologiczne, 10:356
50. Nelson, G.S. ; Rickman, R. ; 1961
Feral trichinosis in Africa
Trans. Roy. Soc. Trop. Med-Hyg. 55:514-517

51. Oliver Gonzalez, J. 1940
The "in vitro" action of immune serum on the larvae and adult of T. spiralis.
Journal of Infections Diseases, 67:292-300
52. Olsen, O.W. ; Robinson, H.A. 1958
Role of rats and mice in Transmitting T. spiralis through their feces.
Journal Parasitology, 44(Sec2) 35.
53. Palmer, F. ; Cavallaro, J. 1984
El laboratorio en inmunología clínica. Editorial Medica Panamericana . 2ª edición (Buenos Aires, 1984).
54. Perales Argueda, F. 1982
Brote de triquinosis causado por la ingestión de carne de jabalí.
Inmunologica, III(84):50-59
55. Rausch, R. 1953
Animal borne diseases.
Publ. Hlth. Repts, 68,533.
56. Rodriguez de Cepeda, A. 1878
La triquinosis en Villar del Arzobispo.
Actas de la Real Sociedad Española de Historia Natural, 6:32-33
57. Rodriguez Osorio, M. ; Gomez Garcia, V. ; Gonzalez Castro, J;
Perez Garro, M.C. 1972
Estudio del valor diagnóstico de las pruebas del látex, hema-
glutificación indirecta e inmunodifusión en la triquinosis huma-
na, con motivo de un brote epidémico ocurrido en el Carpio
(Córdoba)
Revista Ibérica de Parasitología, 32:33-41
58. Rodriguez Osorio, M. ; Gomez Garcia, V. ; Gonzalez Castro, J. 1974
Encuesta epidemiológica preliminar sobre triquinosis en la pro-

vincia de Granada.

Revista Ibérica de Parasitología, 34(3-4):253-256

59. Rodriguez Osorio, M. ; Gomez Garcia, V. ; Campos Bueno, M. 1977
Inespecificidad de la prueba de inmunofluorescencia indirecta
para la triquinosis en sueros de pacientes con fiebres tifoideas.
Revista Ibérica de Parasitología, 37(1-2): 81-85
60. Rodriguez Osorio, M. ; Gomez Garcia, V. 1978
Consideraciones experimentales del empleo de la técnica micro
ELISA para la investigación de antígenos en sueros de animales
infestados en el laboratorio con T.spiralis.
IIª Reunión Anual Asociación Parasitólogos España, Madrid, 1978.
61. Roselle, H.A. ; Cchwartz, D.T. ; Geer, F.G. 1965
Trichinosis from New England Bear. Meat: Report of an epidemic,
New England.
Journal Medical, 272:304-305
62. Roth, H. 1941
The "in vitro" action of trichina larvae in immuniserum. A new
precipiting test in trichinosis.
Acta pathologica et microbiologica Sacandinavida, 18:160-167
63. Ruitenberg, E.J. ; Steerenberg, P.A. ; Brosi, B.J. ; Buy, J. 1974.
Serodiagnosis of T.spiralis infection in pigs by enzyme linked
immunosorbent assay.
Bulletin of the Wold Health Organization, 51(1):108-109
64. Ruitenberg, E.J. ; Steerenberg, P.A. ; Brosi, B.J. ; Buys, J. 1975
ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) as preventive and re-
presive control method for the detection of T.spiralis infec-
tions in slaughter pigs.
Wiadomosce Parazytologiczne, 21:747-751.

65. Ruitenberq, E.J. ; Steerenberq, P.A. ; Brosi, B.J. ; Buys, J. 1976
Evaluation of realiability of immunoenzimatic techniques for the serodiagnosis in T.spiralis infections.
Immunoenzimatic techniques. Editado por: Feddman, G. ; Druel, P. Bignon, J. Avramear, S. North Holland/Publishing Company-Amsterdam, Oxford, 149-166
66. Ruitenberq, E.J. ; Steerenberq, P.A. ; Brost, B.J. ; Buys, I. 1976
Reliability of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of T.spiralis infection in conventionally raised pigs.
Journal of Immunology Methods, 10(1):67-83
67. Sadun, E.H.,Anderson, R.I. ; Williams, J.S. 1962
Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of trichinosis.
Experimental Parasitology, 12:423-433
68. Scholtens, R.G.,Kagan, I.G. ; Quist,K.D. ; Norman, L.G. 1966
An evaluation of tests for the diagnosis of trichinosis in swine and associated quantitative epidemiologic observation.
Journal Epidemiology, 83:489-500
69. Smith, H.V. ; Kennedy, M.N. 1984
Soluble antigens and antibodies in the sera of mice infected with T.spiralis detected by a modified double conterimmuno-electrophoreses technique.
Journal Helminthology, 58(1):71-74
70. Spink, W.W. 1935
Cardiovascular complications of trichinosis.
Arch. Intern. Med. 56:238-249
71. Stumpf, J ; Undeertsch, K. ; Landgraf, F.1981
Results of the clinical and serological diagnosis of an epidemic of T.spiralis.

- Trichinellosis. Editado por : Kim, C.W. ; Ruitenberg, E.J. ;
Teppema, J.S. Reedbooks Ltd Fox Lane North, Chertsey, Surrey,
England. 279-282
72. Suessenguth, H. ; Kline, B.S. 1944
A simple rapid flocculation slide test for trichinosis in man
and in swine.
American Journal of Clinical Pathology, 14:471-481
73. Sulzer, A.J. 1965
Indirect fluorescent antibody tests for parasitic diseases.
I. Preparation of a stable antigen from larvae of T.spiralis.
Journal Parasitology, 51:717-721
74. Sulzer, A.J. ; Emily S.Chisholm, B.S. 1966
Comparison of the IFA and other tests for T.spiralis antibodies.
Public. Health Reports, 81(8):729-734
75. Uhlikova, M. ; Hubner, J. 1970
Application of the fluorescent complement staining in the sero-
diagnosis of trichinosis.
Folia Parasitologica. Praha, 17:183-189
76. Van Knapen, F. ; Kociecka, W. ; Franchimont, J.H. 1981
Trichinella pseudospiralis and T.spiralis infections in monkeys.
IV. Serological aspects.
Trichinellosis. Editado por: Kim, C.W. ; Ruitenberg, E.J. ;
Teppema, J.S. Reedbooks Ltd Fox Lane North, Chertsey, Surrey,
England. 215-219
77. Von Zenker, F.A. 1860
Veber die Trichinenkrankheit des Meuscheu.
Arch. Path. Anat. 18:561-572
78. Watsky, B. ; Waha, F. ; Price, A. 1940
Serodiagnosis of trichinosis by means of complement-fixation.

79. Witemberg, G.G. 1964
Helminthozoonoses. 1. Nematodiasis, pp. 529-601. In J. Vander
Hoeden (ed.) Zoönoses.
Elevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York.
80. Yamaguchi, T. 1978
Report on trichinellosis in Japan.
Wiadomosci Parazytologiczne, 24(1)% 114-117
81. Yang, J. 1982
Antigen specificity in ELISA of somatic extracts and metabolic
products from Toxocara, Ascaris and Trichinella.
Abstracts del V Congreso Internacional de Parasitología. Toronto
(Canadá); 1982.237
82. Zimmerman, W.J. ; Stecte, J.H. ; and Kagan, I.G. 1968
The changing status of trichiniasis in the U.S. population.
Publ. Hlth. Repts. 83:957-966
83. Zolnierkowa, D. 1959
Epidemiological investigations on the focus of trichinellosis
in the Klodzko district in 1959
Wiadomosci Parazytologiczne, 6:575-583.