

# Revisión de los brotes de triquinelosis detectados en España durante 1990-2001\*

Esperanza Rodríguez de las Parras<sup>a</sup>, Mercedes Rodríguez-Ferrer<sup>a</sup>, Javier Nieto-Martínez<sup>a</sup>, Florencio M. Ubeira<sup>b</sup> y Teresa Gárate-Ormaechea<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. <sup>b</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología. Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. A Coruña. España.

**INTRODUCCIÓN.** La triquinelosis es una nematodosis de distribución cosmopolita producida por *Trichinella* spp. y transmitida por el consumo de carne infectada cruda o poco hecha. En este trabajo se revisan los brotes de triquinelosis humana declarados durante 1990-2001, analizando su distribución geográfica y la fuente de infección.

**MÉTODOS.** Se realizó el examen parasitológico de las carnes sospechosas mediante digestión clorhidropéptica y la caracterización molecular de los aislamientos de *Trichinella* a través de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) y *Western-blot* con los anticuerpos monoclonales US5 y US9. La detección de anticuerpos anti-*Trichinella* de los pacientes se llevó a cabo por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

**RESULTADOS.** De los 49 brotes declarados durante 1990-2001, un 75,5% tuvo como fuente de infección la carne de jabalí frente al 14,3% producido por consumo de carne de cerdo. La fuente de infección se desconocía en el 10,2% restante. En nuestro laboratorio se siguieron 21 brotes de los 49 registrados, de los cuales sólo en 13 se pudo llevar a cabo la identificación molecular de la especie de *Trichinella* implicada, y se encontró que el 61,5% estaba producido por *T. britovi* y el 38,5% por *T. spiralis*. El diagnóstico serológico de los afectados por IFI permitió confirmar en el laboratorio la parasitosis.

**CONCLUSIONES.** La caracterización de marcadores moleculares para la identificación de *T. spiralis* y *T. britovi* revela la importancia de *T. britovi* en la salud pública española.

**Palabras clave:** *Trichinella spiralis*. *T. britovi*. Brotes.

Trichinellosis outbreaks in Spain (1990-2001)

**INTRODUCTION.** Trichinellosis is a helminth infection having a wide geographical distribution. It is acquired by ingestion of raw or undercooked meat infected with *Trichinella* spp. The present work reviews the human trichinellosis outbreaks recorded in Spain during 1990-2001, taking into account

both the geographical distribution and source of the infection.

**METHODS.** The parasite was isolated from suspected meats with the digestion technique. Molecular characterization of *Trichinella* isolates was done by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and Western-blot with US5 and US9 monoclonal antibodies. Anti-*Trichinella* antibodies in the patients' sera were investigated by indirect immunofluorescence (IIF).

**RESULTS.** A total of 49 trichinellosis outbreaks were detected in Spain during 1990-2001, 75.5% produced by ingestion of infected wild boar, 14.3% by infected domestic pig and 10.2% by an unknown source. Of the 49 outbreaks, 21 were followed up in our laboratory. We were able to perform molecular identification of the *Trichinella* species involved in 13 outbreaks, with 61.5% produced by *T. britovi* and 38.5% by *T. spiralis*. Serological diagnosis of the trichinellosis patients by IIF allowed confirmation of helminth infection.

**CONCLUSIONS.** With the use of molecular markers, *T. spiralis* and *T. britovi* were identified as the causative organisms in trichinellosis outbreaks detected in Spain during 1990-2001. These results reveal the importance of *T. britovi* in Spanish public health.

**Key words:** *Trichinella spiralis*. *T. britovi*. Outbreaks.

## Introducción

La triquinelosis es una nematodosis que afecta al hombre y a multitud de mamíferos, producida por las especies del género *Trichinella*, y transmitida por el consumo de carne cruda o poco cocinada parasitada con larvas infectantes L1 del nematodo parásito.

La triquinelosis humana presenta un período de incubación medio de aproximadamente 10 días. Este período, entre otros factores, depende del número de larvas ingeridas, el cual influirá en el grado de intensidad de la enfermedad. Además, la gravedad del proceso también está relacionada con la especie de *Trichinella* de que se trate y de la edad, el sexo y el estado inmunitario del hospedador<sup>1,2</sup>. Es de destacar que las formas más graves de la enfermedad (5-10% de los enfermos) se deben a complicaciones cardíacas y neurológicas<sup>3</sup>. Las manifestaciones clínicas de la fase enteral responden a un cuadro gastroentérico, caracterizado por náuseas y diarrea, y las de la fase parenteral se relacionan con fiebre, eosinofilia, elevación de las enzimas musculares (creatina fosfoquinasa [CPK], lactato

Correspondencia: Dra. T. Gárate-Ormaechea.  
Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III.  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2,2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.  
Correo electrónico: tgarate@isciii.es

Manuscrito recibido el 31-12-2002; aceptado el 19-5-2003.

\*Financiación: Proyectos FIS 94/0321; 97/0141; 00/0787 y Proyecto propio ISCIII MPY 01/1337

TABLA 1. Ciclo, hospedadores y distribución geográfica de las especies y genotipos del género *Trichinella*

Especies o genotipos de <i>Trichinella</i>	Ciclo	Hospedador	Distribución geográfica
<i>T. spiralis</i> (T1)	Doméstico y selvático	Cerdos, carnívoros, ratas	Cosmopolita
<i>T. nativa</i> (T2)	Selvático	Carnívoros	Región ártica y subártica
<i>Trichinella</i> T6	Selvático	Carnívoros	Sur de Canadá, América del Norte
<i>T. britovi</i> (T3)	Selvático	Carnívoros	Áreas templadas de la región paleártica
<i>Trichinella</i> T8	Selvático	Carnívoros	Suráfrica y Namibia
<i>Trichinella</i> T9	Selvático	Carnívoros	Japón
<i>T. murrelli</i> (T5)	Selvático	Carnívoros	Estados Unidos
<i>T. nelsoni</i> (T7)	Selvático	Carnívoros	África subsahariana
<i>T. pseudospiralis</i> (T4)	Selvático	Mamíferos y aves	Cosmopolita
<i>T. papuae</i> (T10)	Selvático, doméstico (?)	Cerdos	Papúa-Nueva Guinea

deshidrogenasa [LDH] y aminotransferasas), erupción dérmica, edema periorbital y palpebral, mialgias, etc.<sup>3,4</sup>.

De acuerdo al protocolo de las enfermedades de declaración obligatoria desarrollado en el año 1996 por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, la definición clínica de caso de triquinosis incluye los signos y síntomas más comunes citados como eosinofilia, fiebre, mialgia y edema palpebral. Se considera caso confirmado aquel que reúne los criterios clínicos de definición de caso y se encuentra confirmado por diagnóstico de laboratorio (presencia de larvas en biopsia, o serología positiva por inmunofluorescencia indirecta [IFI]). En un brote de triquinosis al menos un caso debe ser confirmado por laboratorio.

En la actualidad se estima que en el mundo hay más de 11 millones de enfermos con la nematodosis en estudio, concentrados principalmente en los Balcanes, Rusia, Repúblicas Bálticas, China y Argentina<sup>5</sup>. En el caso de los Balcanes, el aumento de la incidencia de la enfermedad se relaciona con el desastroso impacto de la guerra y la migración de las poblaciones. Además, la alta prevalencia de la triquinosis en animales domésticos y salvajes en estos últimos países ha incrementado de manera considerable el riesgo de importación de carne infestada a la Unión Europea<sup>6</sup>. De hecho, la Unión Europea invierte cada año un total de 570 millones de dólares para el control de esta nematodosis<sup>7</sup>.

Dentro del género *Trichinella* se han identificado un total de diez genotipos, siete con nivel de especie (*T. spiralis* [T1], *T. nativa* [T2], *T. britovi* [T3], *T. pseudospiralis* [T4], *T. murrelli* [T5], *T. nelsoni* [T7] y *T. papuae* [T10]) y tres presentan una categoría taxonómica incierta (*Trichinella* T6, T8 y T9)<sup>8</sup>. Las especies *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* muestran una distribución cosmopolita, mientras que el resto de los genotipos se encuentran restringidos a una zona geográfica determinada, tal como se recoge en la tabla 1.

La situación epidemiológica de la triquinosis en España es semejante a la que presentan los países del este de Europa, donde coexisten los ciclos doméstico y selvático, contrastando con la descrita en otros países de la Cuenca Mediterránea, como Italia y Francia, con la única existencia de la forma selvática<sup>9</sup>. La persistencia del ciclo doméstico en nuestro país se debe principalmente a las prácticas tradicionales de cría de cerdos en régimen extensivo, así como al hábito de alimentación de estos animales con productos de desecho de cocina y mataderos. Además, las

dos especies circulantes, *T. spiralis* y *T. britovi*, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, contribuyendo a la interconexión entre el ciclo doméstico y selvático y a la transmisión de la enfermedad, lo que constituye un importante factor de riesgo<sup>10</sup>.

En este trabajo se revisan los brotes de triquinosis humana declarados en nuestro país durante 1990-2001, analizando las fuentes de transmisión y su distribución geográfica. Además, a partir de las muestras relacionadas con alguno de los brotes, y remitidas al Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, se aislaron de las carnes sospechosas las larvas de *Trichinella*, se determinó la carga parasitaria y se realizó la identificación molecular de los aislamientos a nivel de especie. En relación con los sueros de pacientes recibidos, se estudió la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella* para confirmar en el laboratorio la parasitosis. Por último, debe señalarse que también se trató de correlacionar los datos clínicos disponibles de los afectados con la especie de *Trichinella* identificada en cada uno de los brotes.

## Métodos

### Muestras cárnicas

Las características de las distintas muestras cárnicas y productos elaborados (embutido) recibidos durante el período 1990-2001 en el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III y supuestamente implicadas en brotes humanos se recogen en la tabla 2.

### Examen parasitológico

Las muestras se sometieron a digestión clorhidropéptica al 1% para el aislamiento de las larvas infectantes L1 de *Trichinella* sp.<sup>11</sup>, utilizándose como mínimo 35 g de cada una de ellas.

### Material parasitario

Los diferentes aislamientos de *Trichinella* obtenidos, así como las cepas de referencia españolas de *T. spiralis* (ISS116/T1) y de *T. britovi* (ISS11/T3), se mantuvieron en el laboratorio por pases continuos en ratones Swiss hembras.

### Caracterización molecular de los aislamientos de *Trichinella* spp.

El ADN crudo de las larvas L1 de *Trichinella* spp. se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez et al<sup>12</sup>. El aislamiento del ADN genómico purificado se realizó básicamente según el protocolo de Simpson et al<sup>13</sup>. La identificación de marcadores moleculares diagnósticos de las especies de *Trichinella* españolas, *T. spiralis* y

TABLA 2. Características de las muestras cárnicas implicadas en brotes de triquinosis recibidas en el servicio de parasitología durante el período 1990-2001

Año	Tipo de muestra	Procedencia	Digestión clorhidropésica (carga parasitaria en larvas/g)	Técnica de caracterización	Especie
1990	Embutido (carne de cerdo y jabalí)	Toledo	26	—	—
1993	Embutido (carne de cerdo)	Cuenca	6	RAPD	<i>T. britovi</i>
	Embutido (carne de jabalí y cerdo)	Madrid	0,2	—	—
1994	Embutido (carne de jabalí)	Teruel	84	RAPD	<i>T. britovi</i>
1995	Embutido (carne de cerdo)	Jaén	3	—	—
	Embutido (carne de jabalí)	Guadalajara	No aislamiento	—	—
1996	Embutido (carne de jabalí)	Jaén	44	—	—
1997	Embutido (carne de jabalí)	Cáceres	9	—	—
	Embutido (carne de jabalí)	Toledo	No aislamiento	—	—
	Embutido (carne de jabalí)	Cáceres	1,4	RAPD	<i>T. spiralis</i>
1998	Embutido (carne de jabalí)	Santander	2	RAPD	<i>T. britovi</i>
1999	Embutido (carne de jabalí)	Zaragoza	5	RAPD	<i>T. britovi</i>
	Embutido y carne de cerdo	Madrid	1,6	RAPD, US5, US9	<i>T. spiralis</i>
	Embutido (carne de jabalí)	Toledo	3,2	RAPD	<i>T. britovi</i>
2000	Embutido (carne de cerdo y jabalí)	Huesca	0,5	RAPD	<i>T. spiralis</i>
	Embutido (carne de jabalí)	Granada	13	RAPD	<i>T. britovi</i>
	Carne de jabalí	Cuenca	20	RAPD	<i>T. britovi</i>
2001	Embutido (carne de jabalí)	Jaén	0,002	—	—
	Embutido (carne de jabalí)	La Rioja	20	US5, US9	<i>T. britovi</i>
	Embutido (carne de cerdo)	Toledo	1,7	US5, US9	<i>T. spiralis</i>
	Embutido (carne de jabalí)	Toledo	4	RAPD, US5, US9	<i>T. spiralis</i>

RAPD: random amplified polymorphic DNA.

*T. britovi*, se llevó a cabo mediante la técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)<sup>12</sup>.

A partir de 100-200 larvas musculares L1 de *Trichinella* spp. se preparó un extracto crudo proteico en tampón fosfato-salino (PBS)<sup>14</sup>. Los extractos se analizaron mediante la técnica de enzimoimmunoanálisis (EIA) sobre membranas de nitrocelulosa (*Western-blot*)<sup>15</sup> con los anticuerpos monoclonales US5 y US9<sup>16</sup>.

### Diagnóstico serológico de los pacientes

La determinación de anticuerpos anti-*Trichinella* se realizó por IFI<sup>11</sup>, considerándose como positivas aquellas muestras séricas con un título superior o igual a 1/20. Se debe indicar que nuestro laboratorio y su

personal técnico están autorizados por la Comisión de Bioética del ISCIII para llevar a cabo este tipo de trabajos.

## Resultados

### Fuentes de infección y distribución geográfica de los brotes de triquinosis detectados en España durante 1990-2001

De los 49 brotes de la enfermedad declarados (fig. 1), con una media de 5 brotes al año, en el 75,5% el origen fue el

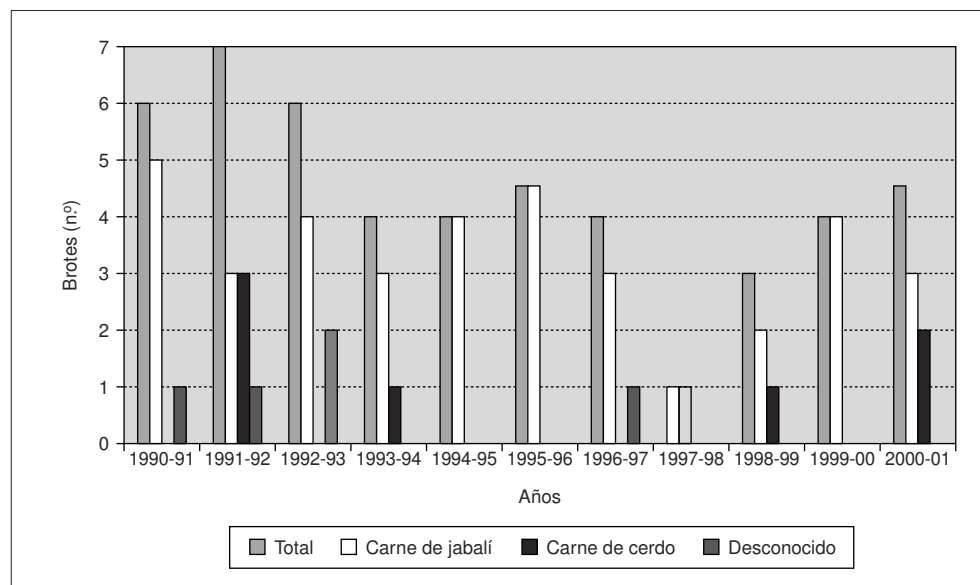


Figura 1. Declaración de los brotes de triquinosis en España en los años 1990-2001.

consumo de carne o productos elaborados (embutido) de jabalíes abatidos en cacerías, y en el 14,3% la fuente de infección fue el cerdo criado en granjas familiares, causando brotes que afectaron a pequeñas comunidades de tipo familiar<sup>17,18</sup>. El 10,2% restante fue de origen desconocido.

Con respecto a su distribución geográfica por Comunidades Autónomas, como se muestra en la figura 2, se puede apreciar que los brotes en estudio se concentran en cinco áreas principales: a) Cordillera Cantábrica y área pirenaica; b) Cordillera Ibérica; c) Cordillera Central; d) Montes de Toledo, y e) Cordillera Bética.

### Seguimiento de brotes de triquinosis en el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III

En el Laboratorio de Helminología de dicho servicio se siguieron un total de 21 brotes de los 49 mencionados (tablas 2 y 3). El seguimiento consistió en el examen de muestras, carnes sospechosas y sueros de pacientes, así como en la recogida de otros datos de interés.

Así pues, para el estudio de las carnes se tomaron como mínimo 35 g de cada una de ellas para llevar a cabo la digestión clorhidropéptica, con el fin de aislar las larvas musculares infectantes L1 de *Trichinella* spp. Después se calculó la carga parasitaria de éstas, o número de larvas por gramo de carne, como medida del índice de capacidad reproductiva (ICR), que es característico de los diferentes genotipos de *Trichinella*. La tabla 2 incluye la carga parasitaria determinada en las diferentes muestras, que fue muy variable según los aislamientos, y osciló entre 0,002 larvas/g a 84 larvas/g para los aislamientos de Jaén (2001) y Teruel (1994), respectivamente.

Posteriormente, una vez obtenido el material parasitario se procedió a realizar la caracterización molecular de los distintos aislamientos. Se utilizaron dos tipos de técnicas:

1. RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), a partir de ADN de las larvas de los distintos aislamientos, purificado o crudo<sup>19</sup>.
2. Anticuerpos monoclonales anti-*Trichinella* (US5, US9), con extractos proteicos de estas larvas.

La figura 3 muestra los patrones de amplificación obtenidos a partir de ADN purificado (fig. 3A) o ADN crudo (fig. 3B) de los aislamientos Cañete y Albarracín, mediante la técnica RAPD y utilizando los cebadores arbitrarios M-are, M-1 y  $\lambda$ gt11F. Los aislamientos Vasallo (ISS116/T1) y Monegrillo (ISS89/T3) se incluyeron como controles de referencia de *T. spiralis* y *T. britovi*, respectivamente. De esta manera, se confirmó que los aislamientos en estudio se correspondían con *T. britovi*. La figura 4 incluye los resultados obtenidos en la caracterización de los aislamientos con los anticuerpos monoclonales US5 y US9.



**Figura 2.** Distribución geográfica de los brotes de triquinosis detectados en España en 1990-2001.

El anticuerpo monoclonal US5 es específico de gp53 de *T. spiralis* y US9 reconoce un epitopo presente en este antígeno que es compartido por las especies encapsuladas<sup>16</sup>. El *Western-blot* realizado con el extracto proteico del aislamiento Móstoles y revelado con los anticuerpos monoclonales citados, permitió identificar dicho aislamiento como *T. spiralis*. Como controles se emplearon los extractos proteicos crudos de los aislamientos Vasallo (*T. spiralis*) y Monegrillo (*T. britovi*).

Gracias al empleo de las metodologías indicadas, se concluyó que, de los aislamientos de *Trichinella* analizados, el 61,5% se correspondían con *T. britovi* y el 38,5% con *T. spiralis* (tabla 2). Hay que comentar que no se pudo realizar la tipificación molecular en un 38% de los aislamientos.

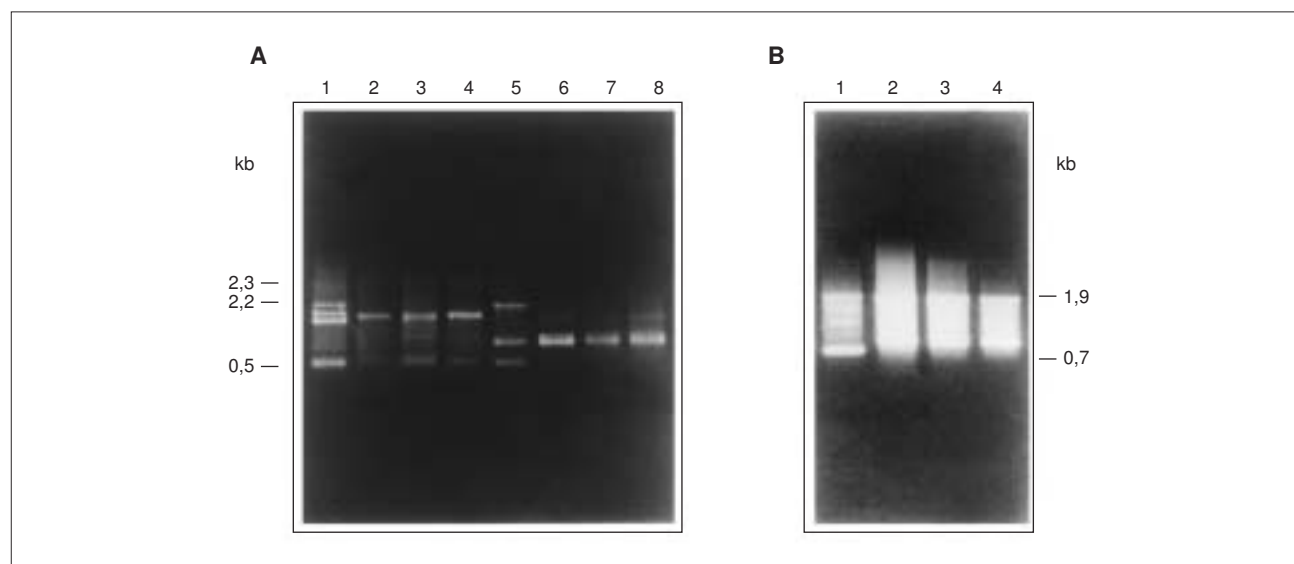
Con respecto a los pacientes, en la tabla 3 se recogen los resultados serológicos por IFI, obtenidos de pacientes relacionados con brotes en los que se pudo llevar a cabo la caracterización molecular del aislamiento de *Trichinella*. Los títulos oscilaron entre 1/40 y 1/1.280.

Por último, en relación con su sintomatología, y según los datos facilitados por los especialistas involucrados, es de destacar la información obtenida sobre los pacientes afectados por los brotes declarados en Huerta del Marquesado (Cuenca) y en Albarracín (Teruel), en 1993 y 1994, respectivamente, con *T. britovi* como agente causal, en los que los síntomas más frecuentes fueron mialgias (90%), fiebre (67%) diarrea (60%) y edema facial (60%). La mayoría de los enfermos también exhibieron eosinofilia y elevación

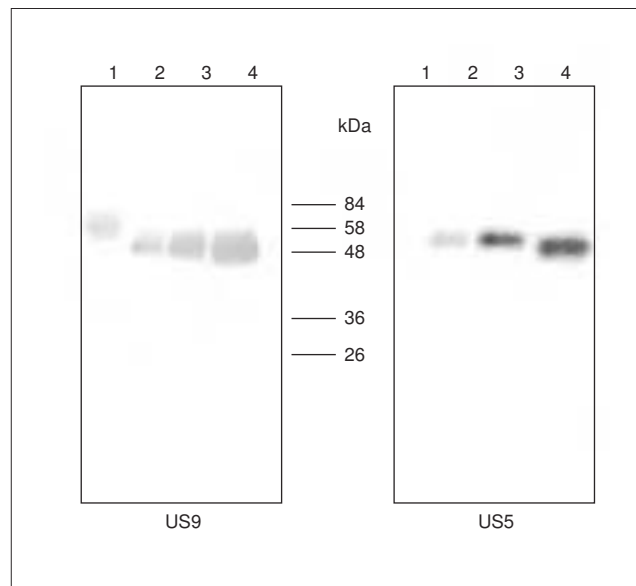
**TABLA 3.** Datos serológicos obtenidos por inmunofluorescencia indirecta (positivo  $\geq 1/20$ ) de los pacientes implicados en tres brotes de triquinosis humana recibidos en el servicio de parasitología (ISCIII)

Aislamiento	Alimento	Brote	Fecha	Afectados	Positivos
Cañete	Embutido de carne de cerdo	Hospital Marquesado (Cuenca)	1993	19	11
Albarracín	Embutido de carne de jabalí	Albarracín (Teruel)	1994	38	6
Móstoles	Embutido de carne de cerdo	Móstoles (Madrid)	1999	11	4





**Figura 3.** A) Patrones de amplificación obtenidos por RAPD a partir de ADN purificado utilizando los cebadores M-are y M-1. Líneas 1 y 5: aislamiento referencia *T. spiralis* Vasallo (ISS116/T1); líneas 2 y 6: aislamiento Cañete. Líneas 3 y 7: aislamiento Albarracín. Líneas 4 y 8: aislamiento referencia *T. britovi* Monegrillo (ISS89/T3). Líneas 1-4: cebador M-are. Líneas 5-8: cebador M-1. Los productos fueron fraccionados en gel de agarosa al 0,8% y teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr). A la izquierda del gel se muestra el marcador de tamaño molecular  $\lambda$ DNA-Hind III. B) Patrones de amplificación obtenidos por RAPD a partir de ADN crudo de cinco larvas infectantes L1 utilizando el cebador  $\lambda$ gt11F. Línea 1: aislamiento referencia *T. spiralis* Vasallo (ISS116/T1). Línea 2: aislamiento Cañete. Línea 3: aislamiento Albarracín. Línea 4: aislamiento referencia *T. britovi* Monegrillo (ISS89/T3). Los productos se fraccionaron en gel de agarosa al 0,8% y teñidos con EtBr. A la derecha del gel se muestra el marcador de tamaño molecular  $\lambda$ DNA-BstEII.



**Figura 4.** Reconocimiento diferencial de gp53 en extractos proteicos de larvas infectantes L1 de *Trichinella* por los anticuerpos monoclonales US5 y US9 mediante Western-blot. Línea 1: extracto crudo de larvas musculares del aislamiento de referencia *T. britovi* (ISS11/T3). Líneas 2 y 3: extracto crudo de larvas musculares del aislamiento a caracterizar (aislamiento Móstoles). Línea 4: extracto crudo de larvas musculares del aislamiento de referencia *T. spiralis* Vasallo (ISS116/T1). Los extractos proteicos se analizaron en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y transferidos a membrana de nitrocelulosa. Los filtros se incubaron con US5 y US9 y como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG (H + L) de ratón marcada con peroxidasa. Para el revelado de las bandas de precipitación se empleó diaminobenzidina. En el centro de la figura se muestra el marcador de peso molecular en kDa.

de las concentraciones de CPK y LDH<sup>20</sup>. Además, los pacientes del brote de triquinosis por *T. spiralis*, registrado en Móstoles (Madrid) en el año 1999, mostraron una sintomatología semejante con el 80% de mialgias, el 40% de cefaleas, fiebre en el 60% de los casos, diarrea en el 20% y edema facial en el 20% de los pacientes<sup>21</sup>.

## Discusión

A pesar de las medidas de control vigentes en España de inspección veterinaria obligatoria de cerdos y jabalíes dirigidos a consumo, se han detectado en el periodo comprendido entre los años 1990 y 2001 un total de 49 brotes de triquinosis, con el jabalí como fuente principal de transmisión y una distribución geográfica singular. Así, de los 49 brotes declarados, el 75,5% tuvo como origen el consumo de carne o productos elaborados (embutido) de jabalíes abatidos en cacerías. Esta observación pone de manifiesto un importante cambio en la fuente de transmisión de la triquinosis en nuestro país, apreciándose una mayor relevancia del jabalí frente al cerdo en la infección del hombre, en contraste con la que presentaba España años atrás, donde el cerdo criado en régimen intensivo era la principal causa de infección humana<sup>22</sup>. Por otro lado, la distribución geográfica por Comunidades Autónomas de los brotes en estudio coincide con la focalidad descrita por Martínez-Fernández<sup>23</sup> en las cinco áreas principales previamente reconocidas. Es importante reseñar que como se puede suponer los brotes mencionados se debieron al consumo de productos cárnicos procedentes de cazas furtivas o matanzas domiciliarias clandestinas y, por tanto, sin el oportuno control veterinario.

Respecto al seguimiento de los brotes realizado en el Servicio de Parasitología del Instituto de Salud Carlos III, en total se estudiaron 21 de los 49 brotes mencionados, analizando carnes sospechosas, sueros de pacientes y otros datos de interés. En este sentido, todas las carnes disponibles se sometieron a digestión clorhidropéptica con el fin de aislar las larvas musculares de *Trichinella* implicadas en los brotes y calcular la carga parasitaria o IRC, parámetro biológico característico de los diferentes genotipos de *Trichinella*. En este sentido, si bien algunos autores han utilizado el IRC como un marcador para la diferenciación de las especies del género *Trichinella*<sup>24</sup>, nuestros resultados no permitieron llegar a ninguna conclusión, ya que los valores determinados de carga parasitaria fueron muy variables e imposibles de correlacionar con los IRC descritos para los distintos genotipos de *Trichinella*<sup>25</sup>.

Posteriormente, una vez obtenido el material parasitario se procedió a realizar la caracterización molecular de los distintos aislamientos, comprobándose que *T. spiralis* y *T. britovi* eran las especies involucradas en los brotes seguidos. Se emplearon dos aproximaciones, basadas en el polimorfismo del ADN o en la caracterización de la variabilidad antigénica de gp53 descritos en las distintas poblaciones del género *Trichinella*. Gracias a las técnicas de amplificación del ADN parasitario, más concretamente con la técnica RAPD, se confirmó que en nuestro país las dos especies mencionadas alcanzan al hombre<sup>20</sup>. Hay que destacar que, aunque las especies de *Trichinella* que circulan en nuestro medio, *T. spiralis* y *T. britovi* habían sido diagnosticadas previamente mediante ensayos biológicos<sup>26</sup>, bioquímicos<sup>27</sup> y moleculares<sup>28,29</sup>, se pensaba que *T. spiralis* estaba implicada en brotes humanos y *T. britovi* restringida a ambientes silvestres, si bien la susceptibilidad del hombre a *T. britovi* ya se había observado en otros países mediterráneos<sup>9</sup>. Es importante destacar que la técnica RAPD es un método fiable, sencillo y sensible de amplificación de ADN que, mediante oligómeros elegidos al azar y sin un conocimiento previo de la secuencia que se va a analizar, posibilita detectar la variación genética de los aislamientos estudiados a partir de pequeñas cantidades de ADN, purificado o crudo, como molde de reacción<sup>19</sup>. También se debe mencionar que la utilización del ADN crudo permite obtener los resultados en 24 h, y evitar los 30 días de espera que se requieren para el aislamiento de suficiente material parasitario para emplear en los largos protocolos de preparación de ADN purificado. Además, en aquellos brotes en los que se obtuvieron parásitos muertos de las piezas cárnicas (sobre todo con embutido) y no se pudo aplicar la técnica RAPD, se dispuso de dos anticuerpos monoclonales (US5, US9) que posibilitan el diagnóstico diferencial de las especies en estudio, *T. spiralis* y *T. britovi*, a través del reconocimiento diferencial del antígeno de secreción gp53 de *Trichinella*<sup>16</sup>. El anticuerpo monoclonal US5 es específico de gp53 de *T. spiralis* y US9 reconoce un epítipo presente en este antígeno que es compartido por las especies encapsuladas. De esta manera, se diagnosticaron los aislamientos implicados en los brotes de La Rioja y Toledo (cerdo) ocurridos en el año 2001, aislamientos que no habían rendido amplificación al aplicar los protocolos RAPD descritos, o bien complementar el diagnóstico realizado por RAPD en los brotes declarados en Madrid en el año 1999 y en Toledo (jabalí) en el 2001.

Por último, se debe indicar que en el 38% de los aislamientos no se pudo realizar la tipificación debido a: a) no disponibilidad de las herramientas moleculares específicas hasta 1993, y b) mal estado del material parasitario aislado.

Con respecto a los pacientes, en las muestras séricas enviadas a nuestro servicio se realizó la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* mediante la técnica de IFI, con resultados variables. Aunque los datos no son concluyentes, al igual que ocurrió con la valoración de la sintomatología asociada a los distintos brotes al disponer tan sólo de información parcial, todas las evidencias que se manejan apuntan a que no existen diferencias en la respuesta del paciente –serología/síntomas– frente a las infecciones por *T. spiralis* y *T. britovi*.

Para terminar es importante destacar que desde el punto de vista epidemiológico, el diagnóstico diferencial de las especies de *Trichinella* circulantes en nuestro país presenta gran relevancia ya que posibilita dibujar el mapa epidemiológico de distribución de *T. spiralis* y *T. britovi*, pone de manifiesto la importancia tanto del ciclo doméstico como del ciclo selvático en la transmisión de la enfermedad al hombre, y permite un mejor diseño de las medidas de control de esta parasitosis.

#### Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a la Dra. M.<sup>a</sup> Luisa Sánchez Serrano, perteneciente al Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, por su apreciada ayuda en la recogida de datos de los brotes declarados de triquinosis en nuestro país. También a la Dra. M.<sup>a</sup> Jesús Perteguer, miembro del Servicio de Parasitología, por su colaboración en el diagnóstico de los últimos brotes de triquinosis. Al Dr. Juan Olmedo del Servicio de Microbiología Alimentaria y a todas aquellas personas de los Servicios de Sanidad de las diferentes Comunidades Autónomas que nos remitieron las muestras cárnicas analizadas, así como a los Servicios de Microbiología de los centros hospitalarios implicados en este estudio.

#### Bibliografía

1. Pozio E, Varese P, Gómez-Morales MA, Croppo GP, Pellicia D, Bruschi F. Comparison of human trichinellosis caused by *T. spiralis* and *T. britovi*. Am J Trop Med Hyg 1993;48:568-75.
2. Pawloski ZS. Clinical aspects in man. En: Campbell WC, editor. *Trichinella* and Trichinosis. New York: Plenum Press, 1983; p. 367-402.
3. Clausen MR, Meyer CN, Krantz T, Moser C, Gomme G, Kayser L, et al. *Trichinella* infection and clinical disease. Q J Med 1996;89:631-6.
4. Capó V, Despommier DD. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. Clin Microbiol Rev 1996;9:47-54.
5. Dupoy-Camet J. Trichinellosis: A worldwide zoonosis. Vet Parasitol 2000;93:191-200.
6. Pozio E. Is horsemeat trichinellosis an emerging disease in EU? Parasitol Today 2000;16:266.
7. Murrell KD, Pozio E. Trichinellosis: The zoonosis that won't go quietly. Int J Parasitol 2000;30:1339-49.
8. Murrell KD, Lichtenfels RJ, Zarlenga DS, Pozio E. The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. Vet Parasitol 2000;93:293-307.
9. Pozio E. Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, ecology and economic impact. Parasitol Today 1998;14:35-8.
10. Pérez-Martín JE, Serrano FJ, Reina D, Mora JA, Navarrete I. Sylvatic trichinellosis in southwestern Spain. J Wildl Dis 2000;36:531-4.
11. Sulzer AL. Indirect fluorescent test for parasitic diseases. Preparation of a stable antigen from larvae of *Trichinella spiralis*. J Parasitol 1965;51:717-21.
12. Rodríguez E, Nieto J, Castillo JA, Gárate T. Characterization of spanish *Trichinella* isolates by random amplified polymorphic DNA (RAPD). J Helminthol 1996;70:335-43.

13. Simpson AJ, Sher A, McCutchan TF. The genome of *Schistosoma mansoni*: Isolation of its size, bases and repetitive sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1982;6:125-37.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.
15. Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD, Selkirk ME. Parasite antigens. Parasite genes: A laboratory manual for Molecular Parasitology. Cambridge: University Press, 1991.
16. Romarís F, Escalante M, Lorenzo S, Bonay P, Gárate P, Leiro J, et al. Monoclonal antibodies raised in *Btk<sup>wt</sup>* mice reveal new antigenic relationship and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:139-49.
17. Rodríguez Osorio M, Gómez García V, Rodríguez Pérez J, Gómez Morales A. Seroepidemiological studies on five outbreaks of trichinellosis in southern Spain. *Ann Med Trop Med Parasitol* 1990;84:181-4.
18. Real del G, Germain IL, Rodríguez E, Sahagún B, Sainz Pardo D, Ramos J. Sero-epidemiological studies on a human population submitted to high risk of *Trichinella* infection. En: Tanner CE, Martínez Fernández AR, Bolás Fernández F, editors. Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis. 1988 Oct 2-6; Alicante, Spain, 1988; p. 405-11.
19. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rifalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:6531-5.
20. Rodríguez E, Nieto J, Rodríguez M, Gárate T. Use of random amplified polymorphic DNA for detection of *Trichinella britovi* outbreaks in Spain. *Clin Infect Dis* 1995;21:1521-2.
21. Martínez Corral JJ, Esteban Niveiro MJ, Oliet Palá A. Triquinosis producida por el consumo de carne de porcino infestado con *Trichinella spiralis*. Investigación y estudio de un brote alimentario. *Profesión Veterinaria* 2000;46:36-9.
22. Rodríguez-Osorio M, Gómez-Morales MA, Gómez-García V, López-Cortez L, Cuello-Contreras JA, Pachón-Díaz J. Estudio de un amplio brote de triquinosis humana, mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). *Rev Iber Parasitol* 1987;47: 283-7.
23. Martínez-Fernández AR. Triquinosis en España. En: Mas-Coma S, Esteban JG, Bargues MD, Valero MA, Galán-Puchades MT, editors. Proceedings of the I Congreso Internacional de las Asociaciones Sudoccidental-Europeas de Parasitología (ICASSEPI). 1991 Jul 1-5; Valencia, Spain, 1991; p. 360-1.
24. Belosevic M, Dick TA. *Trichinella spiralis*: Comparison of stages in host intestine with those of an arctic *Trichinella* sp. *Exp Parasitol* 1979;48:432-46.
25. Pozio E, La Rosa G, Murrell KD. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol* 1992;78:647-53.
26. Martínez-Fernández AR, Armas Serra C, Gómez Barrio A, Bolás Fernández F. Single pair cross-hybridization test among spanish *Trichinella* isolations. En: Tanner CE, Martínez Fernández AR, Bolás Fernández F, editors. Trichinellosis. Proceedings of the Seventh International Conference on Trichinellosis. 1988 Oct 2-6; Alicante, Spain, 1988; p. 96-106.
27. La Rosa G, Pozio E, Rossi P, Murrell KD. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol* 1992;78:641-6.
28. Gárate T, Albarrán E, Bolás Fernández F, Martínez Fernández AR, Parkhouse RME. DNA polymorphism with spanish *Trichinella* isolates. *Parasitol Res* 1991;77:602-5.
29. Chacón MR, Rodríguez E, Parkhouse RME, Burrows PR, Gárate T. The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. *J Helminthol* 1994;68:109-13.