

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *TRICHINELLA SPIRALIS* EN MUESTRAS DE SUERO DE PORCINOS

MOLECULAR DIAGNOSIS OF *TRICHINELLA SPIRALIS* IN PIG SERA SAMPLES

Mariana Inés Recavarren (Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires / Instituto de Análisis Fares Taie), **Silvina Quintana** (Instituto de Análisis Fares Taie), **Silvio Krivokapich** (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán"), **Exequiel Scialfa** (Ministerio de Salud Provincia de Buenos Aires), **Ivana Viera** (Instituto de Análisis Fares Taie) y **Vanesa Di Gerónimo** (Instituto de Análisis Fares Taie).

Resumen: El objetivo de este proyecto es generar una herramienta preventiva de diagnóstico, sensible y específica, basada en técnicas de avanzada en biología molecular, para la triquinelosis, una de las enfermedades zoonóticas más importantes de nuestro país, con el fin de evitar el consumo de carnes infectadas con el parásito *Trichinella spiralis* y proponer a futuro un programa epidemiológico de erradicación en piaras. Para ello se cuenta con muestras de músculos y chacinados de cerdo y suidos silvestres y se contará con muestras de suero de cerdos inoculados con larvas recién nacidas de *T. spiralis*.

Palabras clave: diagnóstico, PCR en tiempo real, *Trichinella spiralis*, cerdos.

Summary: The objective of this project is to generate a sensitive and specific preventive diagnostic tool for one of the most important zoonotic diseases in our country, trichinosis, based on advanced techniques in molecular biology, aiming at avoiding consumption of *Trichinella spiralis*-infected meat and proposing a future epidemiological eradication program in herds. The work will be done on samples of pork and wild swine muscle and sausages, as well as blood samples of pigs inoculated with newborn larvae of *T. spiralis*.

Keywords: Diagnosis, Real Time PCR, *Trichinella spiralis*, swine.

Introducción

El presente trabajo está enmarcado en el desarrollo del proyecto galardonado con el 3.º premio de la categoría Sanidad Animal para Grupos de Investigación en formación en la primera edición del certamen "Premios Senasa a la Investigación, Transferencia y Comunicación de la Sanidad, la Calidad y la Inocuidad Agroalimentarias" instituido por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.

La triquinelosis o trichinellosis es una zoonosis emergente en varias regiones del mundo y se la considera un grave problema para la salud pública. En la Argentina hubo 5217 casos notificados en humanos, en el período 1990-1999 (Bolpe y Boffi, 2001) y 5820 entre 2000 y 2010 (Ministerio de Salud de la Nación, 2000-2010). Es causada por el nematodo *Trichinella* que se transmite principalmente por la ingestión de carne de cerdo infectada, cruda o mal cocida, o sus productos derivados.

El método recomendado por la Comisión Internacional de Triquinelosis para el diagnóstico de la infección por *Trichinella* en alimentos es la técnica de digestión artificial, la cual implica la digestión *in vitro* del tejido muscular con ácido clorhídrico y pepsina, seguida de la visualización microscópica y la cuantificación de las larvas del parásito. No obstante, esta técnica tiene una baja sensibilidad, ya que generalmente se analizan muestras compuestas o *pooles* de 100 g de tejido para maderos y de 10 g en muestras individuales, y no siempre el material remitido al laboratorio es el recomendado para cerdos domésticos (diafragma y masetero).

La técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), basada en la detección de inmunoglobulina G (IgG) contra antígenos del parásito, es la prueba serológica comúnmente utilizada en el diagnóstico de la infección por *Trichinella* en muestras de sueros de cerdos vivos (Uparanukraw *et al.*,

1997). Aunque es un método indirecto y sólo proporciona evidencia de la exposición a *Trichinella*, los ensayos de ELISA permiten una, mejora en la sensibilidad de la prueba en comparación con la técnica de digestión artificial; sin embargo existen desventajas debido a la pérdida de la especificidad por la reacción cruzada del antígeno con otras infecciones parasitarias del huésped (Nöckler *et al.*, 2009).

Las técnicas basadas en la amplificación de ADN mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reacción en cadena de la polimerasa), como el método de PCR multiplex y la RFLP, son capaces de detectar y diferenciar a nivel de especie las muestras parasitadas por *Trichinella* (Soule *et al.*, 1993; Zarlenga *et al.*, 1999 y 2001; Wu *et al.*, 1999). Sin embargo las metodologías basadas en PCR convencional presentan baja sensibilidad y no son cuantitativas (Espy *et al.*, 2006).

Métodos moleculares de detección como la PCR en tiempo real ofrecen una alta sensibilidad y especificidad, ya que permiten la detección del ADN del parásito en un escaso volumen de muestra. La PCR en tiempo real es una amplificación selectiva de una región específica dentro de un ADN blanco que es cuantificado con marcadores fluorescentes durante la reacción. Permite la detección cualitativa y la medición cuantitativa del ADN del parásito (Jauregui *et al.*, 2001; Learmount *et al.*, 2009). Así, se detecta el patógeno responsable de la infección con una alta especificidad y sensibilidad, rápidamente (dos horas) y en gran escala. Se han descrito varios ensayos de PCR en tiempo real, dirigidos a diferentes genes para la detección específica del ADN de *T. spiralis*. Estos ensayos se han aplicado al estudio de muestras de la vida silvestre (Cuttel *et al.*, 2012; Atterby *et al.*, 2009) o para el estudio de modelos experimentales (Li *et al.*, 2010; Golab *et al.*, 2009). Guenther *et al.*, desarrolló una metodología de PCR en tiempo real para detección de ADN de *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis* en cerdos domésticos infectados que mostró una sensibilidad de 0,1 LPG (Guenther *et al.*, 2008), pero no hay antecedentes sobre detección de *T. spiralis* por PCR en tiempo real realizado en muestras de suero derivadas al laboratorio de diagnóstico.

Objetivo general

El objetivo general del trabajo es generar una herramienta de diagnóstico molecular sensible y específica para una de las enfermedades zoonóticas más importantes de nuestro país: la trichinelosis, con el fin de evitar el consumo de carnes infectadas con este parásito y proponer un programa epidemiológico de erradicación en piaras.

Objetivos específicos

Este trabajo se divide en tres partes. En la primera se desarrolló un ensayo de PCR en Tiempo Real utilizando control interno (ADN de cerdo) y los cebadores o "primers" específicos diseñados por nosotros (Quintana *et al.*, manuscrito en

preparación) para la detección de *Trichinella spiralis* en muestras de músculo de cerdo, jabalí y sus subproductos, que son los más comúnmente consumidos en la Argentina. Una segunda parte estará orientada al diagnóstico en suero de cerdos vivos para control epidemiológico. La tercera consistirá en el diagnóstico temprano a partir de muestras de sueros de humanos, que permitirá implementar un tratamiento precoz y evitar, así, el enquistamiento de las larvas en los músculos y futuras secuelas de los pacientes.

Metodología

En nuestro laboratorio se ha logrado desarrollar una técnica de PCR en tiempo real con control interno para la detección sensible y específica de ADN de *T. spiralis* en muestras de músculo, que fue contrastada con la técnica de digestión enzimática en 21 muestras (Quintana *et al.*, manuscrito en preparación). Vale la pena recalcar que para el desarrollo de dicha metodología se utilizaron cebadores de diseño propio. De las 21 muestras estudiadas, 2 resultaron positivas por digestión enzimática y también resultaron positivas por la técnica de PCR en tiempo Real diseñada. El hallazgo más importante fue que 5 muestras negativas por la técnica de digestión enzimática fueron positivas por PCR, lo cual demuestra que la técnica desarrollada presenta una mayor sensibilidad que la prueba patrón o "prueba de oro" (*gold standard*).

Con el presente proyecto se busca ampliar las actividades ya realizadas y lograr poner a punto una metodología de extracción de ADN a partir de muestras de suero porcino y humano. Además, se pretende implementar las metodologías de biología molecular desarrolladas para la detección de ADN de *T. spiralis* tanto en muestras de suero de porcinos como en pacientes humanos, con el fin de contar con una nueva herramienta diagnóstica para triquinosis. Para ello se propone realizar un desafío experimental inoculando lechones con larvas recién nacidas de *T. spiralis* y tomar muestras diarias para evaluar la sensibilidad y la especificidad de la nueva técnica molecular. Asimismo, se pretende estudiar cerdos criados bajo diferentes sistemas de producción y focos porcinos, para facilitar la vigilancia y el control epidemiológico, y sueros de pacientes con sintomatología clínica específica derivados por médicos y centros hospitalarios con consentimiento informado.

Una vez obtenidas las muestras de suero, se evaluarán diferentes metodologías para la extracción de ADN. Se corroborará el éxito de las extracciones mediante cuantificación del ADN y amplificación por PCR en tiempo real de los controles internos correspondientes. Se llevará a cabo la cuantificación de ADN presente en las muestras extraídas mediante el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen), utilizando el termociclador en tiempo real Rotor Gene 6000.

Controles internos de amplificación. Con el fin de chequear el éxito de la extracción de ADN y la inexistencia de inhibición en

las reacciones de PCR, se realizará, en el caso de muestras porcinas, una amplificación mediante PCR en tiempo real con cebadores (CERH y CER L) que detectan ADN porcino. En el caso de muestras humanas se realizará una amplificación mediante PCR en tiempo real con los cebadores beta actina 99 fw y rv (cebadores de diseño propio), que detectan un fragmento de 99 pb de ADN humano. Se considerarán aceptables para el estudio de la presencia de *T. spiralis* por PCR en tiempo real aquellas muestras con valores de Ct (Ciclo umbral o *Cycle Threshold*) del control interno <35.

Control interno de muestras humanas. Las amplificaciones de un fragmento de 99 pb de ADN de humano (con cebadores de diseño propio) se llevarán a cabo en un termociclador Rotor Gene 6000, en un volumen final de 20 µl, utilizando EvaGreen como intercalante fluorescente. El programa de ciclado para la detección consistirá en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C y 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 54 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Una vez finalizada la amplificación se efectuará una curva de disociación (*melting curve*), siendo la Tm del producto amplificado de 84,5 °C. La amplificación se acepta si el control positivo presenta producto de PCR del peso molecular esperado (Tm: 84,5 °C) y el control sin templado no lo presenta.

Control interno de muestras porcinas. Las amplificaciones de un fragmento de 133 pb de ADN porcino se llevarán a cabo en un Termociclador Rotor Gene 6000, en un volumen final de 20 µl, utilizando EvaGreen como intercalante fluorescente. El programa de ciclado para la detección consistirá en una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95 °C, y 35 ciclos de 94 °C por 20 s, 51 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Una vez finalizada la amplificación se efectuará una curva de disociación (*melting curve*), siendo la Tm del producto amplificado de 80,5 ± 1 °C (Figura 2). La amplificación se acepta si el control positivo y las muestras analizadas presentan un producto de PCR del peso molecular esperado (Tm: 80,5 ± 1 °C) y no lo presentan el control negativo de ADN ni el control sin templado

Reacciones de PCR en tiempo real para la detección de ADN de *T. spiralis*. En aquellas muestras aptas, se llevarán a cabo amplificaciones de un fragmento de 133 pb de ADN de *T. spiralis* (cebadores de diseño propio) en un termociclador Rotor Gene 6000, en un volumen final de 20 µl, utilizando EvaGreen como intercalante fluorescente. El programa de ciclado rápido para la detección consistirá en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95 °C, y 45 ciclos de 94 °C por 10 s, 50 °C por 10 s y 72 °C por 15 s. Una vez finalizada la amplificación se efectuará una curva de disociación (*melting curve*), siendo la Tm del producto amplificado de 73,5 ± 1 °C. La amplificación se acepta si el control positivo (ADN purificado de *T. spiralis*) y las muestras analizadas presentan un producto de PCR del peso molecular esperado (Tm: 73,5 ± 1 °C) y no lo presentan el control negativo de ADN ni el control sin templado.

Las metodologías desarrolladas podrán ser realizadas a largo plazo, dado que las validaciones serán hechas bajo estrictas normas de calidad (ISO 9001, 14001 y 17025, Senasa y OPDS) para asegurar su precisión, sensibilidad y especificidad. Además, podrán ser replicadas en otros laboratorios de diagnóstico que cuenten con el equipamiento de biología molecular necesario.

Este trabajo se realiza en forma conjunta entre instituciones públicas (nacional: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires; provincial: División de Zoonosis Rurales de la Dirección de Atención Primaria de la Salud de la Provincia de Buenos Aires) y una privada (Laboratorio Bioquímico Fares Taie, Mar del Plata). La prioridad es desarrollar un método de diagnóstico novedoso, rápido, sensible y específico de una de las zoonosis más importantes que afectan a nuestro país, utilizando los recursos tecnológicos y humanos disponibles en pos del crecimiento de la salud.

Bibliografía

- Bien, J. (2007), «The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella* spp. infection in pigs», *Wiadomosci parazytologiczne*, vol. 53, n.º 2, pp. 149-151.
- Bolpe, J.; Scialfa, E.; Gallicchio, O. Ledezma, M. Benitez, M.; y P. Aguirre (2013), «Triquinosis en la Provincia de Buenos Aires: Alimentos Involucrados en Brotes de la Enfermedad», *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, vol. 8, n.º 1, pp. 9-13.
- Cuttell, L.; Corley, S. W.; Gray, C. P.; Vanderlinde, P. B.; Jackson, L. A. y R. J. Traub (2012), «Real-time PCR as a surveillance tool for the detection of *Trichinella* infection in muscle samples from wildlife», *Veterinary Parasitology*, vol. 188, n.º 3-4, pp. 285-93.
- Erali, M.; Voelkerding, K. V. y C. T. Wittwer (2008), «High resolution melting applications for clinical laboratory medicine», *Exp Mol Pathol*, 85 (1), pp. 50-8. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.012. Epub 2008 Apr 13.
- Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M. and Vetter, E. (2006), «Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing», *Clinical Microbiology Rev.*, 19, pp. 165-256.
- Golab E, Rozej W, Wnukowska N, Rabczenko D, Masny A. (2009), «Detection of *Trichinella spiralis* DNA in mouse faeces during the early stage of infection», *J Microbiol Methods*, 78 (2), pp. 213-5. doi: 10.1016/j.mimet.2009.05.019. Epub 2009 Jun 6.

Guenther, S.; Nöckler, K.; von Nickisch-Rosenegk, M.; Landgraf, M., Ewers, C.; Wieler, L. H. y Schierack, P. (2008), «Detection of *Trichinella spiralis*, *T. britovi* and *T. pseudospiralis* in muscle tissue with real-time PCR», *J Microbiol Methods*, 75 (2), pp. 287-92. doi: 10.1016/j.mimet.2008.06.019. Epub 2008 Jun 26.

Gutiérrez, G. (2007), *Análisis de la variabilidad genética en cepas de Trichinella spiralis obtenidas de caballos de dos regiones geográficas de México. Tesis para obtener el grado de maestro en biología experimental*, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D. F.

Han, C.; Lu, Y.; Li, X, Shi, Y. Song, M. (2011), «Temporal quantification of Ts43 gene expression of *Trichinella spiralis* using real-time RT-qPCR», *J Microbiol Methods*, 84 (1), pp. 8-11. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.019. Epub 2010 Oct 19.

Istituto Superiore di Sanità Viale Regina Elena [s. f.], «Identification of *Trichinella* Muscle Stage Larvae at the species level by Multiplex PCR. European Union Reference Laboratory for Parasites Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases Unit of Gastroenteric and Tissue Parasitic Diseases» [en línea]. Disponible en: <<http://www.iss.it/binary/crlp/cont/PCR%20method%20WEB%20SITE.1177083731.pdf>>.

Krivokapich, S. J.; Molina, V.; Bergagna, H. F. y E. Guarnera (2006), «Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina», *Journal of Helminthology* vol. 80, pp. 267-269.

Krivokapich, S. J.; Prous, C. L.; Gatti, G. M.; Confalonieri, V.; Molina, V.; Matarasso, H. y E. Guarnera (2008), «Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina», *Veterinary Parasitology*, vol. 156, n.º 3-4, pp. 234-240.

Krivokapich, S. J.; Pozio, E.; Gatti, G. M.; Prous, C. L.; Ribicich, M.; Marucci, G., La Rosa, G. y V. Confalonieri (2012), «*Trichinella patagoniensis* n.sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America», *International Journal of Parasitology*, vol. 42, n.º 10, pp. 903-910.

Li, F.; Wang, Z. Q.; Cui, J. (2007), «Early detection by polymerase chain reaction of migratory *Trichinella spiralis* larvae in blood of experimentally infected mice», *Wiad Parazytol*, 53 (2), pp. 149-51.

Manual de procedimientos para la técnica de digestión artificial en frigoríficos y mataderos de cerdos (2010) [en línea]. Disponible en: <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/manual_digestion_artificial.pdf>.

Ministerio de Salud de la Nación (2010), *Boletín de Vigilancia*, Dirección de Epidemiología, Período 2000-2010, Buenos Aires.

Nöckler, K.; Hamidi, A.; Fries, R.; Heidrich, J.; Beck, R. y A. Marinculic (2004), «Influence of methods for *Trichinella* detection in pigs from endemic and non-endemic European region», *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, vol. 51, n.º 6, pp. 297-301.

Nöckler, K., Reckinger, S.; Broglia, A.; Mayer-Scholl, A. y P. Bahn P. [s. f.], «Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera», *Veterinary Parasitology*, vol. 163, n.º 4, pp. 341-347.

Reed, G. H.; Kent, J. O. y C.T. Wittwer (2007), «High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics», *Pharmacogenomics*, vol. 8, n.º 6, pp. 597-608.

Ribicich, M.; Gamble, H. R.; Bolpe, J.; Scialfa, E.; Krivokapich, S.; Cardillo, N.; Betti, A.; Holzmann, M. L.; Pasqualetti, M.; Fariña, F. y A.. Rosa (2010), «*Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina», *Parasitological Research*, vol. 107, n.º 2, pp. 377-380.

Vossen, R. H.; Aten, E.; Roos, A. y den Dunnen, J. T. (2009), «High-Resolution Melting Analysis (HRMA): more than just sequence variant screening», *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 860-866.

Wittwer, C. T. (2009), «High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations», *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 857-859.

Wu, Z.; Nagano, I.; Pozio, E. e Y. Takahashi (1999), «Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates», *Parasitology*, vol. 118, n.º 2, pp. 211-218.

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

Zarlenga, D. S.; Chute, M. B.; Martin, A, y C. M. Kapel (2001), «A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*», *Parasite*, vol. 8, n.º 2, pp. S24-S26.