

CAPÍTULO 3.1.22.

TRIQUINELOSIS (INFECCIÓN POR *TRICHINELLA* SPP.)

RESUMEN

La ingesta de carne cruda o poco cocida de animales domésticos o de especies cinegéticas que contenga larvas infectantes de *Trichinella* spp. puede causar triquinelosis en el ser humano. Los animales pueden contraer la infección al ingerir tejidos infectados por *Trichinella*. Las larvas infectivas ingeridas maduran y se reproducen en el intestino delgado de la especie hospedadora, incluyendo al hombre, los cerdos, las ratas, los osos, las morsas, ocasionalmente los caballos y cualquier otro mamífero herbívoro no estricto, y las aves y los reptiles. Los gusanos adultos sobreviven menos de 1 mes. Las larvas producidas migran hasta los músculos de sus hospedadores y persisten en ellos, sirviendo de fuente de infección para los nuevos hospedadores susceptibles.

Detección e identificación del agente: Las pruebas de diagnóstico para la detección de *Trichinella* spp. se agrupan en dos categorías: 1) la detección directa de la primera etapa de la larva enquistada o libre en tejido de músculo estriado, y 2) la detección indirecta de la infección por *Trichinella* spp. o la exposición al mismo mediante pruebas de anticuerpos específicos.

Para detectar directamente la infección por *Trichinella* en los tejidos, se utilizan el método de compresión y el método de digestión del tejido muscular. Las larvas de *Trichinella* normalmente se localizan en mayores concentraciones en los músculos preferidos, que varían según la especie hospedadora. Es importante muestrear dichos músculos preferidos para maximizar la sensibilidad. Por ejemplo, en los cerdos, los músculos del diafragma, los maseteros y la lengua son los preferidos por este orden, mientras que, en los caballos, los músculos de la lengua, los maseteros y el diafragma suelen hospedar la mayoría de las larvas, seguidos por los músculos del cuello.

Los métodos de digestión artificial incluyen la digestión enzimática de muestras de tejido muscular individuales o agrupadas, y utilizan la homogeneización o trituración mecánica, la agitación y la incubación. A continuación, se aplican los procedimientos de filtración y sedimentación para recuperar y concentrar todas las larvas que se hayan liberado del tejido muscular durante la digestión. Las muestras procesadas con estos métodos se someten a un examen estereomicroscópico para comprobar la presencia de larvas. Mediante los métodos de digestión se puede detectar < 1 larva por gramo (lpg) de tejido, pero estos bajos niveles de infección, la cantidad de músculo digerido y la desigual distribución de las larvas dentro de los tejidos (así como la escasa digestibilidad de ciertos tejidos y de las muestras de fauna salvaje no óptimas que han sido congeladas o que se han estropeado por otros motivos) constituyen factores limitantes. Este inconveniente se puede compensar mediante el análisis de muestras más amplias de las canales, tales como un mínimo de 3–5 g en el caso de los cerdos y 5–10 g en el caso de los caballos, animales de caza y especies salvajes indicadoras, como los zorros. Estos métodos se recomiendan en la inspección individual de las canales de los animales de abasto, como los cerdos, los caballos y los animales de caza.

El método de compresión (triquinoscopia) es menos sensible que la digestión artificial y no es recomendable como prueba fiable para la inspección de las canales, ni para determinar la inocuidad alimentaria ni en cuanto a fines de vigilancia.

Pruebas serológicas: Las pruebas serológicas son las que con mayor frecuencia se utilizan para la detección indirecta. La sensibilidad y la especificidad de los métodos serológicos dependen sobre todo del tipo y de la calidad del antígeno utilizado. La mayoría de los datos relativos a la realización (validación) de las pruebas serológicas provienen de su aplicación a los cerdos. Se pueden producir falsos negativos de tipo serológico hasta 1 semana o más después de que las larvas de los músculos

se hagan infectivas en cerdos con una infección leve o moderada. También se han descrito falsos positivos en las pruebas serológicas. Para el seguimiento o verificación de rebaños libres de *Trichinella*, son aceptables pruebas serológicas, mientras que para efectuar una inspección individual de la canal, solo pueden recomendarse los métodos directos. En los cerdos se han detectado niveles de 1 larva/100 g de tejido mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA). Los antígenos excretorios/secretorios que se han recogido manteniendo in vitro durante un corto periodo de tiempo (18 horas) las larvas de *T. spiralis* del músculo constituyen actualmente la fuente más específica. Es de suma importancia la utilización de sueros control positivo y negativo adecuados para asegurarse de que los ELISA que se realicen tengan una sensibilidad y especificidad aceptables. Los resultados positivos que se obtengan mediante ELISA deben confirmarse con una inmunoelectrotransferencia. También se recomienda la digestión de 100 g o más de tejido como prueba confirmativa para los animales serológicamente positivos.

Requisitos para las vacunas: No existen vacunas para la infección por *Trichinella* en los animales de abasto.

A. INTRODUCCIÓN

En los animales, los signos clínicos de las infecciones por *Trichinella* no suelen reconocerse, y su principal importancia es como zoonosis. Comer carne cruda o poco cocida de animales domésticos o de caza que contenga larvas infectantes de *Trichinella* spp. puede causar triquinosis en humanos (Gajadhar et al., 2006). Los gusanos adultos de vida corta residen en el intestino delgado de especies hospedadoras, como los seres humanos, los cerdos, las ratas, los osos, las morsas, los caballos, muchos otros mamíferos no estrictamente herbívoros y algunas aves y reptiles. El parásito tiene un ciclo vital directo que se completa dentro de un único hospedador. En las horas siguientes al consumo de tejido con larvas infecciosas por parte de un hospedador adecuado, las larvas musculares de estadio 1 (L1) son liberadas por la digestión y excavan en las vellosidades del intestino delgado. Se convierten en adultos (machos de hasta 1,8 mm de longitud, hembras de hasta 3,7 mm) y sobreviven menos de un mes. Las hembras, que son ovovivíparas, liberan larvas recién nacidas (LRN), que migran a través de vénulas y vasos linfáticos a la circulación general. Las LRN se distribuyen por todo el cuerpo, donde invaden células musculares estriadas y se convierten en larvas infectivas de estadio 1, con predilección por grupos musculares específicos, que varían según la especie hospedadora.

Por ejemplo, en los cerdos, el pilar del diafragma, los maseteros y la lengua suelen contener las mayores concentraciones de larvas, por lo que se toman muestras en ese orden de preferencia, mientras que en los caballos el orden de preferencia es: lengua, masetero, diafragma y músculos del cuello. Los sitios de predilección varían según la especie hospedadora, pero en la mayoría de las especies, el diafragma, la lengua, el masetero y la lengua son sitios óptimos para el muestreo. Actualmente, se conocen los sitios de predilección para varias especies hospedadoras (Gajadhar et al. 2019; ISO, 2015). En casos de infección grave, los músculos estriados contienen un elevado número de larvas. Las larvas de la mayoría de las especies de *Trichinella* se encapsulan en el colágeno de la musculatura del hospedador, donde pueden permanecer infecciosas durante años.

Dentro del género *Trichinella*, se han identificado trece taxones, de los cuales diez han sido designados como especies (Pozió y Zarlenga, 2021; Zarlenga et al., 2020). Los taxones de este género se clasifican en dos grupos (clados); uno caracterizado por larvas que se encapsulan sólo en músculos de mamíferos, y otro caracterizado por larvas que no se encapsulan en los músculos e infectan tanto a hospedadores mamíferos como aves, o a hospedadores mamíferos y reptiles. Los taxones encapsuladores son los siguientes: *Trichinella spiralis* (T1), de amplia distribución y comúnmente asociada a cerdos domésticos; es altamente infecciosa para cerdos domésticos y silvestres, ratones y ratas, pero también se ha detectado en carnívoros mamíferos y caballos; *Trichinella nativa* (T2) se da comúnmente en carnívoros mamíferos de regiones árticas y subárticas de Norteamérica, Europa y Asia (Oksanen et al., 2022). *Trichinella britovi* (T3) se encuentra predominantemente en mamíferos salvajes y cerdos, y ocasionalmente en caballos, y está presente en regiones templadas de Europa, Asia occidental y en el norte y oeste de África. *Trichinella murrelli* (T5) se encuentra en mamíferos carnívoros de Norteamérica; tiene baja infectividad para cerdos domésticos, y se ha reportado en caballos (Scandrett et al., 2018). *Trichinella* T6 está adaptada a climas fríos, está estrechamente asociada a *T. nativa* en el norte de América del Norte, y también es muy resistente a la congelación (Zarlenga et al., 2020). *Trichinella nelsoni* (T7) se ha aislado de carnívoros mamíferos y esporádicamente de cerdos salvajes en África oriental y meridional. *Trichinella* T8 se ha detectado en carnívoros mamíferos de Namibia y Sudáfrica y *Trichinella* T9 en carnívoros mamíferos de Japón (Zarlenga et al., 2020). T8 y T9 comparten algunas características intermedias con *T. britovi* y *T. murrelli*, respectivamente. *Trichinella patagoniensis* (T12) se ha aislado de leones de montaña de Argentina, y se ha demostrado experimentalmente que

tiene poca infectividad para cerdos y roedores (Krivokapich et al., 2012). En 2020, se describió un nuevo taxón, denominado *Trichinella chanchalensis* (T13), a partir de glotones (*Gulo gulo*) del noroeste de Canadá (Sharma et al., 2020). Los taxones no encapsulados incluyen los siguientes: *Trichinella pseudospiralis* (T4) tiene una amplia distribución y se ha recuperado de aves rapaces, carnívoros salvajes y omnívoros, incluidos cerdos domésticos y salvajes, y ratas y marsupiales en Asia, América del Norte, Europa y Australia (Pozio, 2016a); *Trichinella papuae* (T10) se ha descrito en cerdos salvajes y domésticos y en cocodrilos de granja de Papúa, Nueva Guinea, Tailandia y Australia; *Trichinella zimbabwensis* (T11) se ha descrito en cocodrilos de granja y salvajes de Zimbabue, Sudáfrica, Etiopía y Mozambique, en lagartos monitor de Zimbabue y en mamíferos carnívoros de Sudáfrica; experimentalmente, presenta una alta infectividad para un amplio espectro de hospedadores mamíferos, incluidos cerdos y ratas (Pozio y Zarlenga, 2021). La mayoría de las especies y genotipos de *Trichinella* se han detectado en seres humanos, y en general se acepta que todos los taxones de *Trichinella* son muy infecciosos para las personas, lo que representa un riesgo significativo para la salud pública. El riesgo de que se establezca una infección por *Trichinella* en las piaras de cerdos es debido principalmente a *T. spiralis*, y en menor grado a *T. britovi*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* y *T. zimbabwensis*, mientras que no hay pruebas de que otras especies o genotipos puedan desempeñar ese papel.

La triquinosis en los humanos puede ser una enfermedad debilitadora que puede ocasionar la muerte. Los parásitos adultos, de vida corta, en el intestino delgado pueden causar gastroenteritis temporal, pero los síntomas y signos más graves se producen como resultado de la migración y establecimiento de las larvas en los músculos estriados. La enfermedad se transmite principalmente por la ingesta de carne de cerdo o presa infectada que no haya sido suficientemente cocida (ni tratada de ningún otro modo para inactivar el parásito). Aunque la prevalencia de la infección por *Trichinella* en caballos es baja, el consumo de carne de caballo cruda o poco cocida es una fuente conocida de triquinosis en el ser humano (Boireau et al., 2000). Para prevenir la infección en el hombre es necesario inspeccionar la carne procesándola adecuadamente (la cocción es el medio más fiable de inactivación de *Trichinella* spp.; la congelación y el curado de la carne también pueden ser efectivos en función del genotipo que se desee inactivar y de si se utiliza un procedimiento validado) y evitando la exposición de los animales destinados al consumo humano a tejidos que contengan larvas de *Trichinella*, incluyendo los desperdicios de la comida sin cocer, con roedores y con otros animales salvajes (Gajadhar et al., 2006; Noeckler et al., 2019). La carne procedente de especies cinegéticas no estrictamente herbívoras siempre debe considerarse una posible fuente de infección y, por tanto, dicha carne debe ser controlada o cocida cuidadosamente. La *Trichinella* que se encuentra en la carne procedente de la caza (principalmente *T. nativa*, T-6 y, en menor grado, *T. britovi*) puede ser resistente a la congelación y, por lo tanto, la carne de animales de caza congelada que no se haya sometido a análisis puede también suponer un riesgo para la salud pública. Los parásitos del género *Trichinella* circulan básicamente en animales salvajes; en cuanto a los animales domésticos, suelen infectar solo a cerdos asilvestrados o de traspatio, y en ocasiones muy infrecuentes, a los caballos; la carne de caballo o de caza infectada por *Trichinella* se ha relacionado con brotes vinculados al comercio internacional. La importación ilegal de carne de cerdo o jabalí en el equipaje personal ha originado muchos brotes de triquinosis (Pozio, 2021).

Los métodos analíticos para la detección de la infección por *Trichinella* en los cerdos y otras especies o bien sirven (a) para detectar directamente el parásito en las muestras de tejido o (b) para demostrar de forma indirecta la presencia del parásito o la exposición al mismo detectando anticuerpos específicos frente a *Trichinella* spp. en muestras de sangre, suero o líquido tisular (Gajadhar et al., 2009).

La manipulación de laboratorio debe realizarse con procedimientos de bioseguridad y contención adecuados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para los animales*). El riesgo de que los operarios adquieran infección en el laboratorio es muy bajo si se siguen unas buenas prácticas de laboratorio. La transmisión tiene lugar mediante la ingesta de larvas musculares en los tejidos o liberadas mediante digestión artificial. Las larvas desnudas mueren rápidamente cuando son expuestas al medio o a desinfectantes comunes. El material de vidrio u otras superficies contaminadas pueden limpiarse con agua a $\geq 85^{\circ}\text{C}$ o con otros procedimientos apropiados para lisa y eliminar todas las larvas. Los residuos de laboratorio, incluidos restos de muestras deben tratarse hirviéndolos, esterilizándolos en autoclave, incinerándolos o sometiéndolos a otros procesos que permitan matar las larvas y prevenir la re-introducción en el medio. Esto es especialmente importante cuando se analizan muestras que contengan larvas vivas en una zona no endémica.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para la detección de infecciones por *Trichinella* en cerdos y su finalidad

Método	Finalidad					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos positivos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente^(a)						
Digestión artificial	– +	–	–	+++	+++	–
PCR ^(b)	–	–	–	++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	+	+	–	++	–
Inmunolectrotransferencia ^(c)	++	+	+	–	++	–

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoanálisis.

^(a)Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

^(b)La PCR se utiliza como prueba confirmativa y para determinar la especie.

^(c)La inmunolectrotransferencia se utiliza como prueba confirmativa de los positivos en el ELISA.

1. Detección e identificación del agente

Los únicos procedimientos recomendados para la detección de las larvas de *Trichinella* en la carne son las pruebas de digestión enzimática. En varios países se reconoce oficialmente un cierto número de pruebas de digestión con fines comerciales. La Comisión Internacional para Triquinosis (CIT, <http://www.trichinellosis.org>; Gajadhar *et al.*, 2019; Noeckler *et al.*, 2019) recomienda varias de estas pruebas, que constituyen estándares documentados en la UE, Canadá y otros lugares (Comisión Europea, 2015; Forbes y Gajadhar, 1999). Otros métodos oficiales no se recomiendan debido a su nula eficacia o fiabilidad. Las pruebas de diagnóstico modernas deben cumplir con las normas internacionales sobre garantía de calidad, que incluyen datos de validación con una base científica y un diseño que permita el control sistemático y la documentación de los principales puntos de control. También se ha publicado una norma de la Organización Internacional de Normalización (ISO) (18743:2015) para la detección de larvas de *Trichinella* en animales (ISO, 2015). La prueba de la digestión aquí recomendada se basa en las interesantes innovaciones inherentes a algunas pruebas de digestión que se han adoptado para el comercio internacional.

1.1. Procedimiento directo recomendado para analizar tejido muscular

1.1.1. Sensibilidad

La sensibilidad de los métodos analíticos directos depende de la cantidad de tejido examinado y del lugar del que se haya obtenido la muestra. Los métodos directos permiten la identificación de cerdos, caballos u otros animales infectados por *Trichinella* sp. en un plazo mínimo de 17 días después de la exposición al parásito, intervalo que coincide con el tiempo necesario para que las larvas alojadas en los músculos adquieran la capacidad de infectar a un nuevo hospedador. En muestras frescas, los métodos directos son más sensibles. El número de larvas que pueden recuperarse de las muestras disminuye de forma impredecible tras una larga conservación, la putrefacción y la congelación (en concreto, los taxones susceptibles a la congelación). Las

muestras para pruebas de inocuidad alimentaria deben conservarse a 4°C y analizarse cuanto antes. En el caso de las muestras más grandes de fauna salvaje (≥ 10 g), deben analizarse para compensar un posible descenso de la sensibilidad debido a una posible variación de los puntos de elección en estas especies hospedadoras, así como a unas condiciones de conservación más variables. Los métodos actuales para analizar la inocuidad alimentaria en muestras frescas o para la inspección de animales determinados mediante digestión artificial y mediante el empleo de una muestra de 1 g tienen una sensibilidad de aproximadamente tres larvas/g de tejido (lpg), y el análisis de una muestra de 5 g aumenta la sensibilidad a 1 larva por g (lpg) de tejido (Gajadhar *et al.*, 2019; Noeckler *et al.*, 2019). La sensibilidad aumenta considerablemente cuando se dispone de grandes cantidades de tejido (hasta 100 g) para la digestión.

1.1.2. Obtención de muestras

Las pruebas se realizan normalmente en muestras de las canales recogidas post mórtem. Las muestras de los músculos se toman de los sitios predilectos, normalmente de los pilares del diafragma, de los maseteros, o de la lengua en el caso de los cerdos, y de la lengua, de los músculos maseteros y de los pilares del diafragma en el caso de los caballos. En el caso de especies de fauna salvaje en las que se desconocen cuáles son los mejores puntos de muestreo, deben tomarse muestras de la lengua (de elección), los maseteros o el diafragma. El músculo tibial anterior es el lugar de elección en el caso de los zorros. Los tamaños de muestra por motivos de inocuidad alimentaria se basan en la detección fiable de animales que albergan ≥ 1 lpg en tejido, pero a efectos de la vigilancia, se precisa una mayor sensibilidad para aportar datos sobre la prevalencia de la infección más exactos y para superar las limitaciones del muestreo, como las que se producen en el caso de la fauna salvaje. Las muestras para la vigilancia tomadas de los puntos de elección (si se conocen) deben pesar ≥ 10 g. Muestras de 100 g permitirían la detección de apenas 0,01 lpg en el tejido de origen, y si la muestra se obtuviera de un punto de elección, una carga larvaria baja o un resultado negativo indicaría una carga larvaria insignificante en el resto de la canal, con un bajo riesgo asociado de transmisión. En el caso de las pruebas de inocuidad alimentaria, cada prueba de digestión puede asumir hasta 100 g de tejido muscular. Se pueden tomar muestras individuales de 100 g de un único animal, o se pueden tomar varias muestras de menor tamaño de varios animales para obtener una muestra combinada de 100 g. El tamaño de las muestras de cada canal que conforman la muestra combinada determinará la sensibilidad del método por cada muestra. La CIT recomienda muestras de 5 g por cerdo para las pruebas que se realizan en zonas endémicas (Gajadhar *et al.*, 2019). Para analizar la carne de caballo, se requiere un mínimo de 5 g por canal. En el caso de los caballos procedentes de zonas endémicas, o si se consume carne de caballo cruda, se recomienda utilizar una muestra de 10 g (Gajadhar *et al.*, 2019). Analizar estas cantidades de músculo debería prevenir la triquinosis en el ser humano, pero no permite prevenir las infecciones asintomáticas derivadas del consumo de carne infectada con cantidades muy bajas de larvas.

1.1.3. Pruebas confirmativas de muestras digeridas en grupo y para animales serológicamente positivos

Cuando se digiere una combinación de muestras de distintos animales y arroja un resultado positivo, deben emplearse pruebas de digestión adicionales para volver a analizar conjuntos de muestras de un número cada vez menor de animales, hasta llegar a analizar un solo animal con el fin de determinar la identidad del animal(es) infectados. En el caso de los animales que dan positivo en pruebas serológicas, deben analizarse los tejidos mediante digestión para confirmar el estado de infección y para facilitar la recuperación de larvas y la identificación de la especie.

1.1.4. Digestión y detección

- i) Se determina el volumen de la solución de digestión requerida para la digestión (2.000 ml de la solución para 100 g de carne y 1.000 ml para 50 g o menos).
- ii) Solución de digestión para 100 g de carne: Preparar la solución en un vaso de precipitados de vidrio de 3 litros, añadiendo 16 ml de ácido clorhídrico al 25% a 2 litros de agua del grifo precalentada a $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Las soluciones madre de ácido clorhídrico se comercializan en formulaciones distintas del 25% y deben ajustarse en consecuencia (por ejemplo, utilizando 11 ml de una solución madre al 37%). Colocar una varilla agitadora en el vaso, colocar el vaso sobre un agitador magnético y comenzar la agitación. Añadir 10 g de pepsina en polvo o granulada (1: 10.000 NF) o 30 ml de pepsina líquida (660 U/ml). Una vez preparada la

solución, apartar una cantidad suficiente en un recipiente distinto que se utilizará para el aclarado, tal como se describe en el paso vii, a continuación. Se comercializa un kit de ensayo de digestión de *Trichinella* basado en serina proteasa, que no utiliza reactivos peligrosos, como alternativa al ensayo de pepsina/HCl, y ha sido aprobado por la UE únicamente para el análisis de cerdos (se puede solicitar más información al Laboratorio de Referencia de la OMSA, en Italia¹).

- iii) Se retira tanta grasa, fascia y tejido no muscular como sea posible de cada muestra, incluido el epitelio lingual cuando se utilice muestra de lengua.
- iv) Se pesa la cantidad adecuada de carne magra de cada muestra. Se corta cada muestra en trocitos de 1-2 g y se mezclan con otras muestras hasta lograr una cantidad de 100 g.
- v) Se coloca la muestra combinada de carne en un triturador y se añade una pequeña cantidad (50 a 100 ml por 100 g de carne) de líquido de la digestión para facilitar la homogeneización.
- vi) Se tapa y se tritura la carne solo hasta que quede homogénea (no deben quedar trozos de carne y la muestra deben tener consistencia de papilla para bebés o paté grueso), sin triturar en exceso.
- vii) Se transfiere la muestra homogeneizada al vaso de precipitados de vidrio que contiene la barra agitadora y la solución de digestión. Para evitar la pérdida de larvas debido al tejido muscular adherido, el equipo de mezcla debe enjuagarse a fondo con el líquido de digestión que se reservó en el paso ii) anterior y que se volverá a verter en el vaso de precipitados.
- viii) Se coloca la cubeta en la plancha precalentada de un agitador magnético o en una cámara de incubación ajustada a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se cubre la cubeta con papel de aluminio. Se activa el agitador a una velocidad lo bastante alta como para crear un vórtex potente que no salpique. Nota: Si la temperatura de digestión al comienzo de la digestión es inferior a $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, debe dejarse que la muestra se caliente a esa temperatura antes de iniciar el cronometraje de la digestión, si resulta factible. Se controla la temperatura del líquido de digestión de forma periódica mediante un termómetro, sobre todo cuando se use una placa caliente.
- ix) Se deja que continúe la digestión durante 30 minutos. En el caso de las muestras de especies hospedadoras distintas de los cerdos domésticos, o que sean menos digeribles que el diafragma, el tiempo mínimo necesario para una digestión completa puede ser mayor. Además, si la temperatura de digestión desciende por debajo de $45\pm 2^{\circ}\text{C}$, puede que sea necesario más tiempo para que termine la digestión. Esto se puede decidir previa observación de la mezcla de la digestión. Si se observan trozos de tejido muscular, no digeridos, el tiempo de digestión puede prolongarse, pero no debe superar los 60 minutos en total. Hay que asegurarse de no sobrepasar la temperatura de digestión ($45 \pm 2^{\circ}\text{C}$).
- x) Como máximo 5 minutos después de retirar el líquido de digestión de la plancha del agitador magnético o de la cámara de incubación, se vierte aquel, a través de un filtro de malla de 180-200 μm , en un embudo de separación de 2,5 litros o mayor con una relación altura:anchura de alrededor de 2:1 y preferiblemente con tapones de seguridad (llaves de paso) de politetrafluoroetileno (PTFE). Se aclara la cubeta con suficiente agua del grifo a temperatura ambiente utilizando un frasco con eyector y se introducen los restos aclarados en un embudo de separación a través del tamiz.
- xi) Se enjuaga el tamiz en el embudo de separación vertiendo un pequeño volumen de agua del grifo a temperatura ambiente a través de la parte superior del tamiz. El proceso de digestión se considera satisfactorio si los restos que quedan en el tamiz consisten principalmente en una cantidad de tejido no muscular no digerible (normalmente fascia y tejido conjuntivo) que no supere el 5 % de la masa original de la muestra. Se deja reposar el líquido en el embudo de decantación durante 30 minutos (aunque no es necesario, unos golpecitos suaves en la pared del embudo [por ejemplo, cada 10 minutos] pueden facilitar la sedimentación de las larvas en el fondo del embudo).
- xii) Se drenan 40 ml del líquido de la digestión del embudo separador en un tubo cónico o en un cilindro medidor (frasco Pilsner) de 50 ml y se deja durante 10 minutos.

1 [Laboratorios de Referencia - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](https://www.woah.org/)

- xiii) Transcurridos los 10 minutos, se usa una pipeta para retirar 30 ml de la parte superior del líquido (o sobrenadante), dejando en el tubo sin alterar los 10 ml del fondo (no se deben derramar los 30 ml del sobrenadante, ya que eso puede remover el sedimento). Si el analista considera que el líquido de digestión restante no es lo suficientemente transparente como para examinarlo, se puede realizar un paso de enjuague de la siguiente manera: añadir 30 ml más de agua del grifo a los 10 ml de líquido de digestión, dejar reposar otros 10 minutos y, a continuación, retirar 30 ml de sobrenadante.
- xiv) Se remueven con suavidad los 10 ml de líquido de digestión restantes y se transfieren rápidamente a una placa de Petri con una rejilla o a una bandeja para recuento de larvas. Se aclara el tubo o cilindro sobre una placa de Petri dos veces usando 10 ml más de agua del grifo. La capa líquida de la placa de Petri debe tener una profundidad de solo unos pocos milímetros.
- xv) Ha de pasar un mínimo de 1 minuto para que las larvas se depositen en el fondo de la placa de Petri o del recipiente de recuento, luego se utiliza un estereomicroscopio a entre 10× y 20× aumentos a fin de examinar de forma sistemática cada rejilla para detectar la posible presencia de larvas de *Trichinella*. La detección de larvas sospechosas debe confirmarse mediante la identificación de detalles morfológicos utilizando un aumento mayor, por ejemplo, de 40. Si el sedimento todavía está demasiado turbio o es difícil de analizar en esta fase, se procederá a una clarificación adicional como se describe en el paso xviii.
- xvi) El examen debe realizarse inmediatamente después de la digestión; si no es posible, la placa de Petri que contiene el líquido de la digestión puede conservarse refrigerada para examinarla más tarde ese mismo día.
- xvii) Si el líquido de la digestión no se examina antes de que transcurran 30 minutos después de la preparación, y se deja enfriar (o se ha refrigerado), puede ponerse demasiado turbio como para poder examinarlo con precisión, y es posible que haya que clarificarlo como se describe más adelante.
- xviii) Clarificación de la muestra: se transfiere el contenido de la placa de Petri a un tubo cónico de 50 ml utilizando una pipeta. Se aclara la placa de Petri con agua del grifo, añadiendo el agua del aclarado al tubo cónico, y después se tapa la placa de Petri y se reserva. Se añade más agua hasta completar un volumen de 45 ml. Se deja que el tubo se sedimente, sin remover, durante 10 minutos.

Después de los 10 minutos se utiliza una pipeta para retirar el sobrenadante, dejando los 10 ml del fondo sin alterar (no se debe derramar el sobrenadante, ya que eso podría alterar el sedimento). Se reserva el sobrenadante para su eliminación o descontaminación una vez se haya examinado la muestra.

Se repiten los pasos xiv y xv empleando la misma placa de Petri que contenía la muestra inicial y que se reservó en el paso xviii.
- xix) En caso de un resultado positivo o sospechoso, debe analizarse otra muestra de cada una de las canales que haya conformado el digesto combinado inicial. Esas muestras deben digerirse individualmente o en grupos cada vez más pequeños hasta que se puedan identificar los animales infectados.

1.1.5. Identificación de las larvas

Una vez separadas por digestión de la célula muscular, las larvas de la primera fase del ciclo miden aproximadamente 1 mm de largo y 0,03 mm de ancho. El rasgo más característico de las larvas de *Trichinella* es el esticosoma, formado por una serie de células discoides que, dispuestas a lo largo del esófago, ocupan la mitad anterior del cuerpo del parásito. Las larvas de *Trichinella* pueden aparecer enroscadas (a baja temperatura), móviles (a temperatura templada) o en forma de una C (media luna) (cuando están muertas). En caso de duda, las larvas deben observarse con un mayor aumento y deben digerirse más muestras. Si el número de larvas es elevado, deberá repetirse la prueba llevando antes la muestra a una dilución apropiada para obtener recuentos exactos.

Las larvas recuperadas de la digestión muscular pueden conservarse en un vial pequeño (1-2 ml) lleno de alcohol etílico al 70% (concentración final) para su posterior genotipado

mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase la sección B.1.3) en un laboratorio cualificado.

1.1.6. Garantía de calidad

Los laboratorios que utilicen métodos de digestión artificial deben mantener un sistema de garantía de calidad apropiado para garantizar la sensibilidad de la prueba. Los componentes de un sistema de garantía de calidad para la prueba de digestión están descritos en otro lugar y deben incluir el uso regular de pruebas de suficiencia (Forbes *et al.*, 2005, Gajadhar *et al.*, 2009; 2019).

1.2. Otros métodos de detección directa

1.2.1. El método del embudo de separación doble

Esta prueba se recomienda como alternativa al procedimiento de digestión común descrito anteriormente. Este método se diseñó para su aplicación en condiciones estrictas de control de calidad, para minimizar los errores técnicos, y se ha validado ampliamente para su utilización en la carne de cerdo y de caballo (Forbes y Gajadhar, 1999; Forbes *et al.*, 2008). Incluye una técnica de digestión con un spin-bar y embudos de separación secuencial para la sedimentación de las larvas. El procedimiento tiene pocas fases, requiere menos tiempo y apenas necesita fases de clarificación adicionales. Para realizar la digestión se utiliza una cámara de incubación equipada con puertas de cristal transparente y con una temperatura de 45°C. La digestión se realiza en 3 litros de líquido de digestión en un agitador magnético. Tras la digestión, se cuela la suspensión en un embudo de separación de 4 litros a través de una malla de filtro de 177–180 µm, que se aclara meticulosamente con agua del grifo hacia el interior del embudo de separación. Se deja que la suspensión se sedimente durante 30 minutos, y a continuación, los 125 ml del fondo se dispensan directamente en un embudo de separación de 500 ml. Se aumenta el volumen de este embudo separador más pequeño hasta 500 ml añadiendo 375 ml de agua del grifo, y se deja que la suspensión resultante se sedimente durante 10 minutos. Finalmente, se dispensan 22–27 ml de sedimento en una placa de Petri y se examina para comprobar la presencia larvas como se ha descrito anteriormente.

1.2.2. Método de digestión de una muestra combinada asistido mecánicamente/ técnica de sedimentación

En este método se emplea un triturador Stomacher para la fase de digestión y un embudo de separación para la sedimentación de las larvas (*Método equivalente A, Reglamento [CE] N.º 2015/1375; Comisión Europea, 2015*).

1.2.3. Método de digestión asistido mecánicamente de muestras combinadas /técnica de “aislamiento en filtro”

Este método utiliza un mezclador Stomacher calentado para la fase de digestión y un embudo Gelman montado en un matraz Erlenmeyer conectado a una bomba de filtración para la recuperación de las larvas. (*Método equivalente B, Reglamento [CE] N.º 2015/1375; Comisión Europea, 2015*).

1.2.4. Método de digestión automática para muestras combinadas de hasta 35 g

Este método consiste en una cámara de digestión automática y un filtro de membrana para la recuperación y examen de larvas (*Método equivalente C, Reglamento [CE] N.º 2015/1375; Comisión Europea, 2015*). Los pasos críticos de la digestión y la recuperación de larvas son difíciles de controlar en el método automático, y no lo recomiendan ni la CIT ni la OMSA.

1.2.5. Método de agitación magnética para la digestión de muestras combinadas/aislamiento en filtro y detección de larvas mediante una prueba de aglutinación en látex

Este método sólo se considera equivalente para el análisis de carne de cerdos domésticos. El método combina el procedimiento típico de digestión con la detección de larvas mediante aglutinación en látex. (*Método equivalente D, Reglamento [CE] N.º 2015/1375; Comisión Europea, 2015*).

1.2.6. Kit de prueba comercial de digestión artificial para la detección *in vitro* de larvas de *Trichinella* spp. en muestras de carne

Este método basado en la serina proteasa se considera equivalente para analizar carne de cerdos domésticos únicamente (*Método equivalente E, Reglamento [CE] N.º 2015/1375*; Comisión Europea, 2015). El kit se debe utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

1.3. Otras pruebas

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Algunos estudios han puesto de manifiesto que se puede utilizar la PCR para detectar el ácido nucleico de las larvas de la musculatura de los animales infectados. Sin embargo, carece de sensibilidad y no es práctico para el uso sistemático en animales de abasto. La identificación de las especies o los genotipos de *Trichinella* recuperados del tejido muscular puede ser útil para entender la epidemiología de los parásitos en animales, para evaluar el riesgo relativo de la exposición humana y para rastrear la explotación en la que se haya originado la infección. Se han desarrollado cebadores específicos que permiten la identificación a nivel de especie o de genotipo de larvas determinadas, tomadas de tejidos musculares, mediante la PCR (Pozio & La Rosa, 2010; Pozio y Zarlenga, 2021). La CIT (<http://trichinellosis.org/>; Pozio y Zarlenga, 2019) ha elaborado directrices detalladas para esta identificación de larvas de *Trichinella* en estadio muscular. La solicitud para aislar o genotipificar las larvas de *Trichinella* puede enviarse a los Laboratorios de Referencia² de la OMSA.

2. Pruebas serológicas

Se han descrito una serie de pruebas para el diagnóstico de las infecciones por *Trichinella* en los animales domésticos y salvajes (Gamble *et al.*, 2004). También se ha descrito recientemente un ensayo de tira inmunocromatográfica (ICS) que utiliza antígenos excretores/secretores (ES) derivados de larvas y pre-adultos de *T. spiralis* para detectar la infección en cerdos (Wang *et al.*, 2021). Solo el ELISA y la inmunoelectrotransferencia se han validado de acuerdo con las normas de la OMSA (Bruschi *et al.*, 2019). Se pueden solicitar sueros porcinos de referencia al Laboratorio de Referencia de la OMSA, en Italia (Gómez Morales *et al.*, 2015). La CIT ha ofrecido un conjunto uniforme de recomendaciones para la elaboración y el uso de las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos en circulación (Bruschi *et al.*, 2019). El ELISA (con prueba confirmación mediante inmunoelectrotransferencia cuando sea factible) es la única prueba inmunológica recomendada por la CIT. Está autorizado solamente como herramienta de vigilancia para la detección de anticuerpos anti-*Trichinella* en los cerdos; no es fiable para la detección de la infección por *Trichinella* en animales específicos con fines comprobación de la inocuidad alimentaria o de otro tipo.

Aunque otras pruebas serológicas pueden tener algunas aplicaciones prácticas, el ELISA es reconocido generalmente como el método de elección por ser económico, fiable y adaptable a las prácticas de garantía de calidad, aumentando la cantidad de datos de validación y potenciando la sensibilidad y la especificidad cuando se aplica en condiciones adecuadas. Es un instrumento útil para llevar a cabo en poblaciones y se utiliza de forma sistemática para los programas de vigilancia y las investigaciones de los brotes de la enfermedad. Se recomienda realizar las muestras con un método de inmunoelectrotransferencia validado para confirmar todo resultado de ELISA que haya sido positivo (Bruschi *et al.*, 2019). Como prueba confirmativa de los animales que han dado positivo en la serología, se recomienda la digestión de 100 g o más de tejido.

2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

2.1.1. Sensibilidad y especificidad

En los cerdos, se pueden detectar niveles de infección muy bajos (Gamble *et al.*, 2004), de una larva por 100 g de tejido, mediante ELISA. Así pues, la prueba serológica ELISA es útil para la detección de anticuerpos contra *Trichinella* a nivel de exploración o para los programas de vigilancia más amplios. Una desventaja de la serología es la existencia de algunos falsos negativos que se han observado en animales infectados, así como de falsos positivos, que puede ser bastante alto entre los cerdos y jabalíes de traspato y asilvestrados. Los falsos negativos se

2 [Laboratorios de Referencia - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](http://www.woah.org)

pueden atribuir a lo que tarda la respuesta inmunitaria tras la ingesta de larvas infectivas, mientras que los falsos positivos se atribuyen a reacciones cruzadas con otros parásitos y microorganismos. En los cerdos, normalmente no hay niveles detectables de anticuerpos hasta 3–5 semanas o más después de la exposición (amble, 1996; Gamble y Patrascu, 1996; Pozio *et al.*, 2020). Por esta razón, los métodos serológicos no se recomiendan para analizar canales individuales, sobre todo cuando el objetivo es determinar si se cumple la inocuidad alimentaria. Las respuestas serológicas persisten en los cerdos durante un largo período después de la infección sin disminución del título (Pozio *et al.*, 2020); sin embargo, se ha detectado la disminución de anticuerpos en los caballos a los pocos meses de la infección. Por lo tanto, las pruebas serológicas pueden ser poco útiles en los caballos, ya que los títulos de anticuerpos terminan por descender por debajo de los niveles detectables a pesar de la presencia de larvas infectantes en los músculos (Hill *et al.*, 2007; Pozio *et al.*, 2002). Es poco lo que se conoce acerca de las respuestas de los anticuerpos a la infección por *Trichinella* en las especies de caza y otros animales salvajes, pero deben obtenerse muestras de suero de gran calidad con el fin de disminuir la probabilidad de falsos positivos. Existen datos para la validación de la serología relativos al cerdo doméstico, aunque para otras especies solo existe algo de información, como estudios sobre el ELISA y la inmunoelectrotransferencia en jabalíes y perros (Bruschi *et al.*, 2019).

2.1.2. Muestras

La utilización del ELISA para detectar la presencia de los anticuerpos específicos del parásito constituye un método que puede realizarse con suero, sangre entera, plasma o líquido de tejidos recogidos antes o después del sacrificio (Gamble & Patrascu, 1996). Las diluciones utilizadas son distintas en función de si se trabaja con suero o con líquido de tejidos, puesto que la concentración de suele ser superior en el suero que en el líquido tisular (Nockler *et al.*, 2005).

2.1.3. Antígenos

La sensibilidad y la especificidad del ELISA dependen en gran medida de los antígenos utilizados en la prueba. Los antígenos de TSL-1 (*T. spiralis* L1) son los principales componentes de los antígenos ES y los secretan específicamente los esticocitos de larvas vivas. Los TSL-1 cuentan con un epítipo carbohidrato inmunodominante común que es reconocido por todos los animales infectados por *Trichinella*. Los antígenos secretores (ES) de *T. spiralis* usados en el ELISA parecen conservarse en todas las especies y genotipos de *Trichinella*, aunque se hayan detectado ciertas diferencias, y, por lo tanto, deben permitir la detección de anticuerpos específicos en cerdos o en otros animales que hospeden alguno de los taxones conocidos. Se han elaborado preparaciones de antígeno ES que proporcionan un alto grado de especificidad para detectar la infección por *Trichinella* en cerdos (Bruschi *et al.*, 2019; Gamble *et al.*, 1988).

2.1.4. Producción de antígeno

La detección de anticuerpos contra *Trichinella* mediante ELISA se puede realizar utilizando los productos ES de las larvas de *Trichinella* en cultivo (Gamble *et al.*, 1988). A efectos de estandarización, es recomendable que *T. spiralis* se utilice para la producción de antígeno para las pruebas con animales de abasto. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, se ha demostrado que el antígeno preparado de cualquier otra especie de *Trichinella* puede usarse para la detección de anticuerpos en animales infectados independientemente de cuál sea la especie que produce la infección (Bruschi *et al.*, 2019). Los parásitos que van a usarse en la preparación de antígeno deben ser mantenidos por pases seriados en ratones, ratas o cobayas.

Para preparar antígenos que se vayan a utilizar en los ELISA (Gamble *et al.*, 1988), se recuperan larvas de primer estadio de *T. spiralis* de las canales de ratones de campo o de ratas sin piel ni vísceras mediante la digestión en pepsina al 1% con HCl al 1% a 37°C durante 30 minutos (como se ha descrito en la Sección B.1.1.4). Se lavan las larvas (3 veces durante 20 minutos cada vez) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con penicilina (500 unidades/ml) y estreptomomicina (500 unidades/ml). Luego se colocan (a una concentración de 5.000 L1/ml) en DMEM suplementado con HEPES (hidroxietilpiperazina N-2, ácido etanesulfónico N-2) (10mM), glutamina (2mM), piruvato (1mM) y penicilina (250 unidades/ml) / estreptomomicina (250 µg/ml) (DMEM completo) a 37°C en atmósfera con un 10% de CO₂. El medio de cultivo se recupera después de no más de 18 horas, los gusanos se eliminan por filtración y el líquido se concentra bajo presión con una membrana de retención de peso molecular de 5000 Da o mediante un dispositivo de filtración centrífuga que utilice un umbral de peso molecular similar. Los antígenos

ES así recuperados deben complementarse con inhibidores de la proteasa para preservar la calidad y pueden conservarse congelados durante periodos cortos a -20°C o durante más tiempo a -70°C; constan de aproximadamente 25 componentes proteínicos según lo determinado por la SDS/PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio), muchos de los cuales llevan el epítipo del antígeno de diagnóstico carbohidrato TSL-1.

La pureza del antígeno es fundamental para la especificidad del ELISA. Deben seguirse varios pasos para realizar el seguimiento del crecimiento de las bacterias, bien sea de forma visual con el microscopio o recubriendo una muestra de medio. Los cultivos que muestren crecimiento bacteriano, en cualquier grado, deben ser desechados. Las larvas no deben mantenerse en cultivo más de 18 horas; el deterioro de las lombrices después de este tiempo contribuye al escape de antígenos somáticos que reducen la especificidad de la prueba. Los antígenos producidos de la forma descrita deben tener un ratio de absorbancia a 280:260 nm de >1,0. Antes de usarse, los antígenos obtenidos a partir del cultivo *in-vitro* de las larvas de *Trichinella* deben analizarse frente a un panel de sueros que se sepa que son positivos y negativos.

2.1.5. Procedimiento analítico

Más adelante se expone un ejemplo de un ELISA para detectar la infección por *Trichinella* en cerdos. Es esencial que todos los reactivos usados en esta prueba estén estandarizados respecto a una concentración óptima, con el fin de obtener resultados fiables. Los valores típicos se indican en el ejemplo.

- i) Se cubre la placa de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de antígenos ES de *T. spiralis* diluidos a 5 µg/ml en agua tamponada (carbonato/bicarbonato tamponado 50 mM, pH 9,6). Se realiza la cobertura durante 60 minutos a 37°C o toda la noche a 4°C.
- ii) Se enjuagan tres veces los pocillos cubiertos con antígeno en tampón de enjuagar que contenga Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, leche desnatada en polvo al 5% y Triton X-100 al 1,0%. Después de cada lavado, las placas se deben secar.
- iii) Se diluye a 1/50 o 1/100 suero de cerdo en tampón de lavado. Las fuentes alternativas de anticuerpos que pueden usarse en lugar de los sueros son, entre otros, la sangre total o los líquidos de tejidos a una dilución de 1/5 o 1/10 (Nockleret *al.*, 2005). Se agregan 100 µl de suero diluido a los pocillos cubiertos con antígeno. Debe usarse en cada placa una muestra de suero positivo conocida y una muestra de suero negativo conocida con una dilución idéntica a la de los sueros problema. Se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- iv) Se enjuagan tres veces los pocillos como en el apartado ii.
- v) Se añade a cada pocillo 100 microlitros de un anticuerpo anti-IgG porcina obtenido en conejo, purificado por afinidad y conjugado con peroxidasa a una dilución apropiada en tampón de lavado. Tras añadir el anticuerpo secundario, se incuban las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- vi) Se enjuagan tres veces los pocillos como en el apartado (ii) y se enjuagan una vez con agua destilada.
- vii) Se añaden 100 µl de un sustrato de peroxidasa apropiado (por ejemplo, ácido aminosalicílico-5' [0,8 mg/ml] con hidrógeno de peróxido al 0,005%, pH 5,6–6,0).
- viii) Después de 5–15 minutos, se leen las placas para ver la densidad del color a 450 nm en un lector de microtitulación automático. Los valores obtenidos en los ELISA superiores al valor umbral se considerarán positivos (Jacobson, 1998).

Existen adaptaciones comerciales del ELISA. El fabricante debe validar el equipo antes de la concesión de la licencia y el usuario también debe evaluar el funcionamiento del equipo antes de su uso mediante la utilización de muestras de referencia positivas y negativas.

La prueba debe aplicarse en un ambiente en el que se cumplan las normas de gestión de calidad aceptadas internacionalmente, como la ISO 17025.

Además del uso de sueros de referencia estándar, todas las pruebas ELISA comerciales e internas deben evaluarse frente a un banco de sueros control negativo que represente a la población analizada, y frente a un grupo de animales positivos que represente las diferentes etapas de la infección, según las directrices de ICT.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas para la prevención de las infecciones causadas por *Trichinella*.

BIBLIOGRAFÍA

BOIREAU P., VALLEE I., ROMAN T., PERRET C., MINGYUAN L., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A. (2000). *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet. Parasitol.*, **93**, 309–320.

BRUSCHI F., GÓMEZ-MORALES M.A. & HILL D.E. (2019). INTERNATIONAL COMMISSION ON TRICHINELLOSIS: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *Food Waterborne Parasitol.*, **12**, 1–7. e00032. doi: 10.1016/j.fawpar.2018.e00032.

EUROPEAN COMMISSION (2015). **Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat.** *Off. J. European Union*, **L212/7**, 11.8.2015, 7–34 (Regulation as last amended by Commission Implementing Regulation (EC) No 2020/1478: *Off. J. European Union*, **L 338**, 7–9).

FORBES L.B. & GAJADHAR A.A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.*, **62**, 1308–1313.

FORBES L.B., HILL D.E., PARKER S., TESSARO S.V., GAMBLE H.R. & GAJADHAR A.A. (2008). Complete validation of a unique digestion assay to detect *Trichinella* larvae in horse meat demonstrates its reliability for meeting food safety and trade requirements. *J. Food. Prot.*, **71**, 558–563.

FORBES L.B., SCANDRETT W.B. & GAJADHAR A.A. (2005). A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horsemeat for *Trichinella*. *Vet. Parasitol.*, **132**, 173–177.

GAJADHAR A.A., NOECKLER K., BOIREAU P., ROSSI P., SCANDRETT B. & GAMBLE H.R. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations for quality assurance in digestion testing programs for *Trichinella*. *Food Waterborne Parasitol.* **12**, e00059; doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00059.

GAJADHAR A.A., POZIO E., GAMBLE H.R., NOECKLER K., MADDOX-HYTTEL C., FORBES L.B., VALLEE I., ROSSI P., MARINCULIC A. & BOIREAU P. (2009). *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. *Vet. Parasitol.*, **159**, 197–205.

GAJADHAR A.A., SCANDRETT W.B. & FORBES L.B. (2006). Overview of food- and water-borne zoonotic parasites at the farm level. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **25**, 595–606.

GAMBLE H.R. (1996). Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot.*, **59**, 295–298.

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

GAMBLE H.R., POZIO E., BRUSCHI F., NÖCKLER K., KAPEL C.M.O. & GAJADHAR A.A. (2004). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on the Use of Serological Tests for the Detection of *Trichinella* Infection in Animals and Man. *Parasite*, **11**, 3–13.

GAMBLE H.R., RAPIC D., MARINCULIC A. & MURRELL K.D. (1988). Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet. Parasitol.*, **30**, 131–137.

- GOMEZ-MORALES M.A., LUDOVISI A., AMATI M. & POZIO E. (2015). Candidates for reference swine serum with anti-*Trichinella* antibodies. *Vet. Parasitol.*, **208**, 218–224.
- HILL D.E., FORBES L.B., KRAMER M., GAJADHAR A.A. & GAMBLE H.R. (2007). Larval viability and serological response in horses with long-term infection of *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasit.*, **146**, 107–116.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (2015). ISO 18743: Microbiology of the food chain – Detection of *Trichinella* larvae in meat by artificial digestion method. Geneva, Switzerland.
- JACOBSON R.H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17**, 469–486.
- KRIVOKAPICH S.J., POZIO E., GATTI G.M., PROUS C.L., RIBICICH M., MARUCCI G., LA ROSA G. & CONFALONIERI V. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int. J. Parasitol.*, **42**, 903–910.
- NOECKLER K., POZIO E., VAN DER GIESSEN J., HILL D.E. & GAMBLE H.R. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations on post-harvest control of *Trichinella* in food animals. *Food Waterborne Parasitol.*, **12**, 1–9. doi: 10.1016/j.fawpar.2019.e00041.
- NOCKLER K., SERRANO F.J., BOIREAU P., KAPEL C.M. & POZIO E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Vet. Parasitol.*, **132**, 85–90.
- OKSANEN A., KÄRSSIN A., BERG R., KOCH A., JOKELAINEN P., SHARMA R., JENKINS E. & LOGINOVA O. (2022). Epidemiology of *Trichinella* in the Arctic and subarctic: A review. *Food Waterborne Parasitol.*, **28**, e00167. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2022.e00167>
- POZIO E. (2016). *Trichinella pseudospiralis* an elusive nematode. *Vet. Parasitol.*, **231**, 97–101.
- POZIO E. (2021). Chapter 6: Epidemiology. In: *Trichinella* and trichinellosis. Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp:185–263.
- POZIO E. & LA ROSA G. (2010). *Trichinella*. In: Molecular Detection of Foodborne Pathogens, Liu D., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 851–863.
- POZIO E., MERIALDI G., LICATA E., DELLA CASA G., FABIANI M., AMATI M., CHERCHI S., RAMINI M., FAETI V., INTERISANO M., LUDOVISI A., RUGNA G., MARUCCI G., TONANZI D., GÓMEZ-MORALES M.A. (2020). Differences in larval survival and IgG response patterns in long-lasting infections by *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis* in pigs. *Parasit Vectors*. **16**, 520–532. doi: 10.1186/s13071-020-04394-7.
- POZIO E., SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC L., GÓMEZ-MORALES M.A., BOIREAU P. & NOECKLER K. (2002). Evaluation of ELISA and Western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet. Parasitol.*, **108**, 163–178.
- POZIO E. & ZARLENGA D. (2019). International Commission on Trichinellosis: Recommendations for genotyping *Trichinella* muscle stage larvae. *Food Waterborne Parasitol.* **12**, 1-9. doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.e00033
- POZIO E. & ZARLENGA D.S. (2021). Chapter 3: Taxonomy of the *Trichinella* genus. In: *Trichinella* and Trichinellosis, Bruschi F., ed. Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp: 35–76.
- SCANDRETT B., KONECSNI K., LALONDE L., BOIREAU P. & VALLEE I. (2018). Detection of natural *Trichinella murrelli* and *Trichinella spiralis* infection in horses by routine post-slaughter food safety testing. *Food Waterborne Parasitol.*, **11**, 1–5. doi.org/10.1016/j.fawpar.2018.06.001.
- SHARMA R., THOMPSON P.C., HOBERG E.P., SCANDRETT B., KONECSNI W., HARMS N.J., KUKKA P.M., JUNG T.S., ELKIN B., MULDER R., LARTER N.C., BRANIGAN M., PONGRACZ J., WAGNER B., KAFLE P., LOBANOV V.A., ROSENTHAL B.M. & JENKINS E.J. (2020). Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *Int. J. Parasitol.*, **50**, 277–287.

WANG X., TANG B., ZHAO Y., DING J., WANG N., LIU Y., DONG Z., SUN X., XU Q., LIU M. & LIU X. (2021). Development of a rapid and sensitive immunochromatographic strip based on EuNPs-ES fluorescent probe for the detection of early *Trichinella spiralis*-specific IgG antibody in pigs. *Vet. Res.*, **52**, 85. doi: 10.1186/s13567-021-00951-9.

ZARLENGA D.S., THOMPSON P. & POZIO E. (2020). *Trichinella* species and genotypes. *Res. Vet. Sci.*, **33**, 289–296.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la Triquinelosis
(puede consultarse la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte los Laboratorios de Referencia de la OMSA para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la Triquinelosis

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO TRIQUINELOSIS PORCINA.
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023