

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA ARGENTINA**

**Ingeniería Agronómica**

**Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires**

**Trabajo final de graduación para optar por el título de:  
Ingeniero Agrónomo**

Autor: María Teresa Ruarte

Tutor: Dra. Mariana Gabriela Domínguez

Fecha de defensa: 17/12/2019

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

### **Agradecimientos**

A mi familia y amigos por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en este largo camino. En particular a mis padres por darme la oportunidad de estudiar, de enseñarme el valor de luchar por lo que uno quiere.

A mi tutora Mariana Domínguez por su generosidad y dedicación. Gracias por abrirme las puertas y guiarme durante este camino.

A todo el equipo del Instituto de Patobiología del INTA Castelar: Gabriel Morici, Mía Bruttomesso, Javier Schapiro, Christian Cutullé, Natalia Aznar y Carlos Garro.

A la Universidad Católica Argentina, la institución que me permitió completar el sueño de seguir mi vocación.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## Resumen

La triquinosis es una zoonosis parasitaria endémica en nuestro país causada por el nematodo del género *Trichinella* spp. Abarca varias especies con diferente distribución geográfica. El hombre contrae la enfermedad por consumo de carne infectada cruda o mal cocida de cerdo, presas de caza o salazones de esas materias primas.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires, a través del método directo Digestión Artificial Rápida y el método indirecto Western Blot. Se esperaba encontrar un mayor número de animales infectados por esta última técnica, como así también un número mayor de ratas infectadas en establecimientos familiares que en comerciales.

Obtuvimos 6 casos positivos por DAR de un total de 331 y 40 muestras de 111 lo fueron a través de WB. Mediante el análisis estadístico de Fisher comprobamos que existió diferencia significativa en los resultados positivos obtenidos a través de dichas técnicas. Detectamos a su vez agrupaciones espaciales de casos positivos, lo cual nos indican tres zonas de riesgo en nuestra área de estudio. Todas las larvas aisladas fueron genotipificadas confirmando que eran *T. spiralis*. Por otra parte, el análisis entre tipos de establecimiento determinó que no hubo diferencias significativas entre la cantidad de casos positivos en ambos sistemas de crianza.

Se concluye que la aplicación de la técnica serológica Western Blot es importante para la detección del parásito en animales silvestres, la que puede usarse complementariamente para el estudio de la enfermedad y su epidemiología. Por otro lado, no existen suficientes evidencias para afirmar que alguno de los sistemas de crianza de cerdos posea mayor riesgo de infección para sus animales. Es importante seguir profundizando los estudios para aportar más evidencias y resultados sobre esta zoonosis de importancia mundial.

## Palabras clave

*Trichinella sp.*, Digestión Artificial Rápida, Western Blot, Genotipificación.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	6
Taxonomía .....	6
Morfología .....	7
Ciclo del parásito.....	9
En el medio ambiente.....	9
En el hospedador .....	10
Rol de los roedores .....	11
La enfermedad en humanos y en cerdos .....	12
Diagnóstico en medicina veterinaria.....	13
Medidas de control en cría de cerdos.....	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO .....	17
MÉTODOS Y MATERIALES .....	18
Obtención de las muestras.....	18
Diagnóstico directo de triquinosis por la técnica de digestión enzimática artificial (DAR) 19	
Cultivo de larvas del estadio 1 de <i>T. spiralis</i> y producción de antígeno secretor (E/S) 22	
Diagnóstico indirecto de triquinosis por la técnica de western blot .....	23
Genotipificación de larvas: .....	27
Análisis estadístico y espacial .....	30
RESULTADOS.....	32
Análisis descriptivo.....	32
Análisis estadístico.....	37
Análisis espacial.....	38
Genotipificación.....	40
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	45
ANEXO .....	48

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## INTRODUCCIÓN

La triquinosis es una enfermedad zoonótica cosmopolita causada por el parásito nematodo *Trichinella sp.* Su distribución a nivel mundial está asociada a la gran variedad de especies que cumplen el rol de hospedadores; se mencionan más de 100 especies entre mamíferos, aves y reptiles (Winter, 2018).

En lo que respecta al contagio del hombre, en general la transmisión está relacionada al consumo de productos porcinos y de animales de caza. La faena y posterior consumo sin control profesional potencia las probabilidades de que se produzca la infección.

La *Trichinella* fue descubierta en el Reino Unido hace 177 años durante la autopsia de una mujer y se la denominó “*Trichina spiralis*”. Al principio no se le dio mucha relevancia, pero luego en 1860 un patólogo demostró la patogenicidad contra los humanos. A partir de entonces, el interés por parte de los científicos aumentó y comenzó a estudiarse con más detalle. En 1895, Railliet modificó el nombre del género nuevamente pasando a denominarse como se la conoce actualmente, *Trichinella spirallis*. Este cambio se produjo debido a la utilización del nombre genérico anterior en un insecto díptero.

Durante los años subsiguientes, se reportaron muchos casos en humanos debido al consumo de productos porcinos lo cual hizo que científicos, veterinarios y autoridades de la salud pública pusieran gran atención en intentar entender el comportamiento del nematodo y el rol que cumplían los cerdos en el ciclo de éste. (Pozio, 2013).

En la actualidad, la enfermedad ha despertado un gran interés político a nivel internacional por el aumento en los casos denunciados, sobre todo en Asia y Europa del Este, y por las consecuencias económicas que trae (decomiso de mercadería, cierre de establecimientos, costos veterinarios).

Existen diferentes entidades, nacionales e internacionales, que buscan estudiar el comportamiento de *Trichinella sp.* y lograr generar concientización, sobre todo en los grupos de personas más vulnerables, para intentar mitigar las consecuencias de las infecciones de este parásito. Ejemplos de estas organizaciones son la Comisión Internacional para la Triquinosis (ICT), el Instituto Nacional de Tecnología agropecuaria (INTA), el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

## Taxonomía

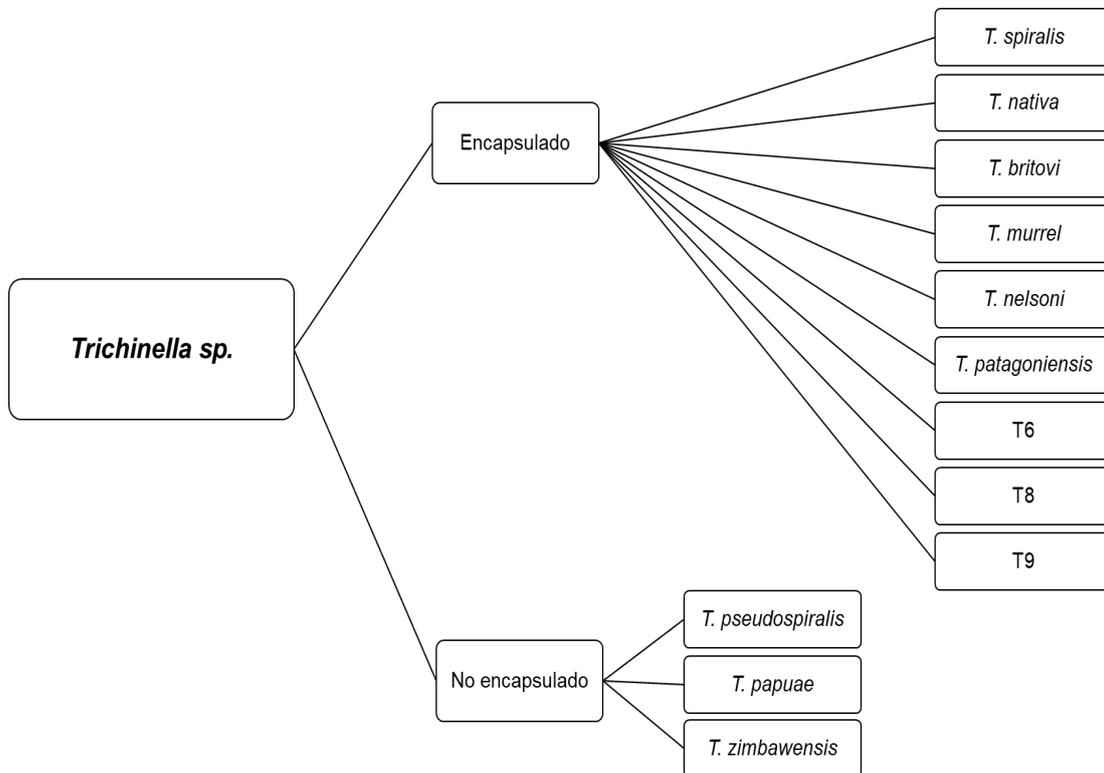
*Trichinella sp.* es un parásito perteneciente al Phylum Nematoda, clase Aphasmida, Orden Enoplida, Superfamilia Trichinelloidea, Familia Trichinellidae.

Dentro del género podemos encontrar una división en función de si es encapsulado o no. Gracias a las técnicas de PCR para la amplificación de ADN se puede diferenciar con exactitud la especie minimizando los errores que podría traer diagnosticar por diferencias biológicas o morfológicas.

La clase que encapsula lo hace una vez llegado al músculo del hospedador y luego genera cambios a nivel celular para asegurar su supervivencia (Pozio, 2013). Este tipo de triquinas parasitan exclusivamente a mamíferos. Se menciona como ejemplo: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrel*, *T. nelsoni*, *T. patagoniensis* y tres genotipos, T6, T8 y T9.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Dentro de la clase que no encapsula distinguimos *T. pseudospiralis*, que parasita mamíferos y aves, y *T. papuae* y *T. zimbawensis*, que infectan mamíferos y reptiles (Pozio, 2013).



**Fig. 1** Esquema de las categorías encapsuladas y no encapsuladas dentro del género *Trichinella sp.* Elaboración propia.

En Argentina fueron identificadas *T. spiralis*, *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y *T. britovi* (Krivokapich, 2006, 2012, 2015, 2019).

## Morfología

Según lo descrito por Riva (2007), los adultos son blanquecinos y filiformes y presentan diferencias en tamaño según si son hembras o machos, alcanzando los 3-4 mm y 1,4-1,6 mm respectivamente. Viven aproximadamente 4 semanas, aunque su longevidad varía según el hospedador. Es característico de la especie el tamaño del esófago ya que ocupa un tercio del largo total del helminto (Foreyt, 2013).



**Fig. 2** Imagen ilustrativa de la morfología de machos y hembras de *Trichinella sp.* extraída de Foreyt (2013).

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Las hembras son monováricas y vivíparas, con capacidad de parir entre 200 y 1500 larvas en función de la especie y el hospedador implicado. Los machos son monórquidos, no poseen espículas y presentan un par de apéndices copuladores cónicos en el extremo posterior del cuerpo.

Las larvas recién nacidas miden 100  $\mu\text{m}$   $\times$  6  $\mu\text{m}$ . Presentan espolón cefálico, estilete bucal y un esticosoma, formado por esticocitos (células glandulares) que contienen gránulos. Estos gránulos tienen la particularidad de poseer un gran poder antigénico al ser excretados (Riva, 2007).

Las larvas musculares miden 1 mm  $\times$  30  $\mu\text{m}$  pudiendo crecer, una vez formado el quiste, hasta 900-1280  $\mu\text{m}$  de largo y 35-40  $\mu\text{m}$  de diámetro. No poseen estilete bucal y la composición de los gránulos del esticosoma es diferente a la de las larvas recién nacidas (Riva, 2007).

## Situación en la argentina

El primer caso reportado en nuestro país fue en el año 1898 cuando una familia, que consumió carne de cerdo en Buenos Aires, presentó síntomas consistentes con trichinellosis. Análisis posteriores de la carne consumida y de ratas capturadas dentro del establecimiento de que provenía el producto, confirmaron la presencia de larvas. Días después, un hombre murió tras haber sido mal diagnosticado con fiebre tifoidea; se realizó una necropsia y se encontraron larvas de *Trichinella* en los músculos. Se logró comprobar a su vez que el hombre había consumido carne junto con la familia anteriormente mencionada. A partir de este suceso es que, en 1899, se determinó la existencia de una relación entre las infecciones en ratas y cerdos con las infecciones en humanos.

La ola de inmigración europea en Argentina influyó a su vez la incidencia de la trichinellosis. Con el proceso migratorio se introdujeron en nuestro país nuevos hábitos, entre ellos el consumo de productos de cerdo crudo como salames, otros embutidos y salazones. Esto resultó notablemente negativo ya que la sumatoria entre el consumo de estos nuevos alimentos con la condición de endemia de la infección en los porcinos resultó en brotes regulares en humanos (Ribicich, 2005).

En la actualidad, la trichinellosis en nuestro país es una zoonosis endémica y constituye un evento de notificación obligatoria, tanto en casos humanos como para brotes en animales, en función de lo establecido en la Resolución 1715/2007. (SIGSA - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales - Dirección Nacional de Sanidad Animal - SENASA). Según una recopilación de elaboración propia en base a los datos del Boletín Integrado de Vigilancia de la Nación durante el período 2008-2018 se diagnosticaron 1496 casos solamente en la provincia de Buenos Aires, lo que representa el 35% de lo identificado a nivel nacional.

La aparición de brotes se atribuye generalmente a cuestiones culturales dentro de la producción pecuaria y al consumo de productos cárnicos porcinos, sus derivados, como los chacinados, y en los últimos años se han registrados casos en humanos por consumo de animales de caza, como puma y jabalí. La cría familiar o domiciliaria de cerdos, una alimentación pobre, generalmente en base a desperdicios, y la ausencia de controles sanitarios durante toda la cadena hacen posible la mantención del parásito a nivel doméstico y en animales de conducta sinantrópica. La estadística de focos registrados en SENASA evidencia que aproximadamente el 85% de los brotes en humanos se origina por el consumo (o venta clandestina) de la faena domiciliaria.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Existen 81 mil establecimientos dedicados a la producción porcina en nuestro país, concentrados en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Del total de predios, el 13% son comerciales, habilitados y sujetos a controles oficiales. Según datos del SENASA la tasa de infección por *Trichinella* en estos lugares es de 0,1%. Los establecimientos restantes son de baja escala productiva, registrados como criaderos familiares y/o de tenencia para la subsistencia. Allí es donde radica la mayor problemática ya que en general carecen de buena sanidad y acompañamiento veterinario por lo que están más expuestos a una posible infección en sus animales.

En general los pequeños productores tienden a hacer faenas en lugares sin habilitación y a producir chacinados caseros o salazones sin el control bromatológico correspondiente, que al no tener ningún tipo de cocción podrían tener las larvas infectantes presentes siendo esta la fuente de infección para ellos y para terceros. Se destaca el hecho de que los cerdos no evidencian sintomatología clínica y la carne no presenta cambios en sus características organolépticas por lo que no se puede identificar a simple vista que el individuo se encuentre infectado.

Según Riva, la emergencia o re emergencia de la trichinellosis en nuestro país, puntualmente “se asocia a los hábitos de consumo de la población, nivel de conocimiento de la enfermedad, existencia de faena doméstica ilegal sin control profesional, falta de reporte de los casos diagnosticados, mal diagnóstico de los casos y cambios en la epidemiología de esta zoonosis”.

## Ciclo del parásito

### **En el medio ambiente**

En función de los autores consultados, distinguimos tres ciclos que se encuentran relacionados entre sí.

- CICLO DOMÉSTICO

Este ciclo hace referencia a los patrones de transmisión que involucran a los cerdos y consecuentemente al hombre, por lo tanto, es el de mayor importancia en lo que respecta a la salud pública.

La infestación de los porcinos puede producirse por el consumo de restos animales infectados, alimentación con basura, residuos cárnicos crudos, transmisión directa entre los individuos por mordidas en cola u orejas, conductas caníbales y a través del contacto con animales sinantrópicos, como son las ratas, ratones, zorros, etc. (Pozio, 2001).

Esta vía de transmisión se asocia con sistemas pecuarios precarios y/o de subsistencia donde por falta de conocimiento o medios económicos, no se garantizan las condiciones de sanidad y nutrición óptimas para los animales, ni un control de los vectores de la enfermedad. Los cerdos buscando compensar carencias nutricionales consumen cualquier cosa, siendo esta la principal razón por la cual terminan comiendo carnes o carcazas de animales infectados.

- CICLO SILVESTRE

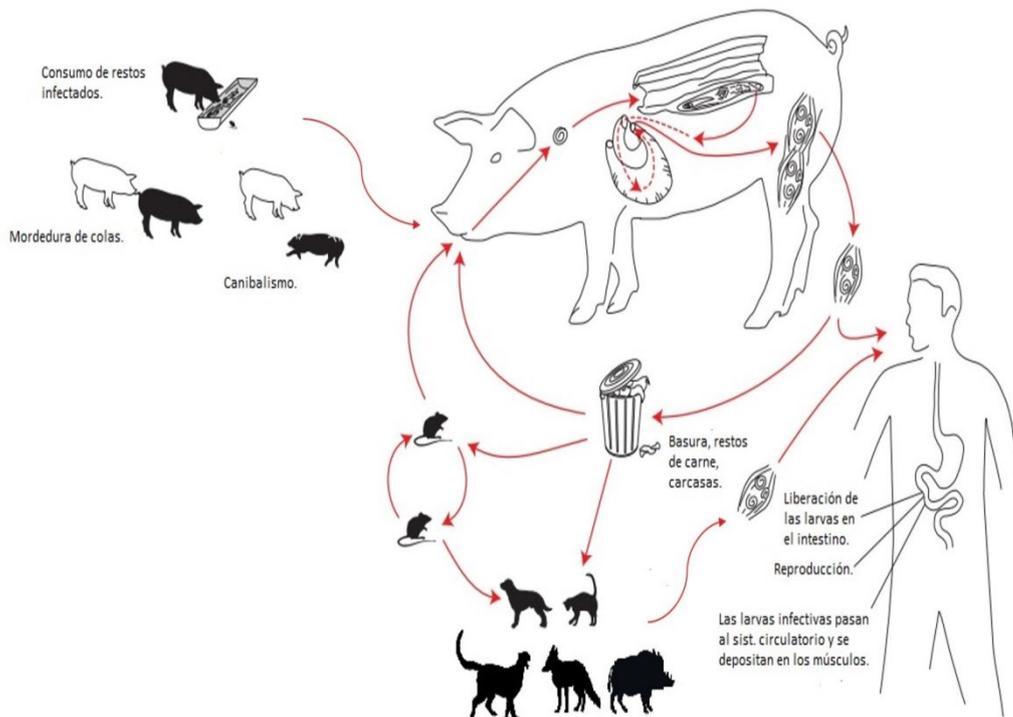
## Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Este ciclo es característico del ambiente salvaje, integrando animales con hábitos alimenticios carnívoros, omnívoros, carroñeros o que presenten canibalismo. En zonas templadas, como es el caso de nuestro país, mencionamos como ejemplos a los jabalíes, zorros, peludos, canidos y félidos, entre otros.

El impacto de las actividades del hombre en el ecosistema puede favorecer o impedir el ciclo silvestre. Un ejemplo de esta condición es el tratamiento que los cazadores le dan a las presas. Si se dispusieran correctamente los restos o carcasas de los animales cazados, posiblemente infectados, evitando que otros carnívoros o carroñeros accedan a los mismos, se podría disminuir la prevalencia de la enfermedad (Pozio, 2001).

### ○ CICLO SINANTRÓPICO

Entrelaza los dos ciclos, doméstico y silvestre, ya que integra los animales que habitan cerca del ambiente humano. Son principalmente gatos, perros, roedores y animales que están ampliando cada vez más su nicho ecológico como los zorros (Riva, 2007). La infección de estos individuos es similar a la del cerdo, pero su papel en la transmisión de la



enfermedad al humano es secundario.

**Fig. 3** Ciclo de la *Trichinella* en el medio ambiente (adaptado de Foreyt, 2013).

### En el hospedador

Una vez que el hospedador ingiere la carne contaminada, durante el proceso de digestión estomacal, se liberan las larvas enquistadas denominadas "L<sub>1</sub> infectantes". Las mismas penetran en las paredes del intestino para alojarse temporalmente en las células epiteliales. Durante las 30 horas posteriores, la larva muda al estadio adulto y se diferencia entre hembra y macho.

Los individuos adultos copulan dentro de la mucosa del intestino y pueden sobrevivir desde 10 días hasta varias semanas según el tipo de hospedador (Foreyt, 2013).

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Los huevos fertilizados se desarrollan dentro del cuerpo de la hembra y son depositados en las paredes del intestino a los 4 o 7 días posteriores a la infección inicial (Foreyt, 2013). Una vez que los huevos eclosionan dentro de la hembra, las larvas recién nacidas penetran la pared intestinal gracias a un estilete bucal y posteriormente entran a sangre o linfa donde podrán distribuirse por todo el cuerpo.

Las larvas migratorias, que a los 17 días post infección adquieren infectividad, tienen preferencia por los músculos estriados, con débil metabolismo glucídico, debido a que se nutren selectivamente del glucógeno muscular acumulado (Riva, 2007). Son elegidos normalmente diafragma, lengua y los músculos maseteros.

Una vez que penetran las fibras musculares por acción de proteasas, generan cambios en las células a través de productos de excreción-secreción larvales que le permitirán la formación de una unidad anatómica independiente y especializada denominada célula nodriza, precursora de la cápsula que contendrá a la larva infectiva. Esta participa en la obtención de nutrientes, en la eliminación de desechos y en el aislamiento de la larva frente a la respuesta inmunológica del hospedador. A partir de los 30 días post infección, se considera al encapsulamiento como finalizado (Riva, 2007).

## Rol de los roedores

En lo que respecta al rol de los roedores, existe una gran discusión sobre si clasificarlos como “reservorio” de la enfermedad o como “hospedadores accidentales”. Se denomina “reservorio” a aquellos animales que pueden mantener las larvas de *Trichinella* en el ambiente por largos períodos de tiempo, sin nuevas introducciones de la enfermedad por otros medios. El término “hospedador accidental” hace referencia a especies animales o restos de cerdo que contienen larvas y que podrían actuar eventualmente como vector, aunque son incapaces de conservar al parásito en el ambiente durante largos períodos de tiempo (Stojcevic, 2004).

El debate comenzó durante el siglo XIX con la publicación de Leuckart (1866) llamada “La teoría de la Rata” (Rat Theory) en la cual califica a las ratas como el mayor reservorio de *T. spiralis* en infecciones sobre cerdos. Otros autores, como Riva, apoyan este planteo y aclaran que los roedores poseen un rol como reservorio no solo por su participación ya conocida dentro del ciclo, sino que también por la “existencia de transmisión transplacentaria en conjunción con la alta capacidad prolfica de estos animales”.

Por otra parte, en 1871 Zenker sugirió que las infecciones en las ratas son simplemente un indicador del riesgo a la exposición con la *Trichinella* en un área determinada y que la verdadera fuente de exposición son los restos de carne y carcasas.

En relación con esta última postura, un estudio posterior, realizado por Stojcevic (2004) también cataloga a las especies de roedores, como *Rattus norvegicus*, como hospedador accidental porque en función de sus estudios solo se encontraron ratas positivas para *Trichinella* cuando había casos de cerdos positivos. Este criterio implica que los roedores se infectan por consecuencia de las malas condiciones de las granjas: “la propagación de restos de carne de cerdo en el medio ambiente por los humanos parece ser siempre la base de la infección con *T. spiralis* en ratas” (Stojcevic, 2004).

Si bien existen diferencias entre si actúan como reservorio u hospedadores secundarios, es una realidad que las ratas poseen una gran participación dentro del ciclo de transmisión de la triquinosis. Es por esta razón que los programas de desratización, controles sanitarios

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

y diseños de infraestructura que separen a los roedores de los animales en producción, cobran una gran importancia a la hora de programar y diseñar las actividades de un productor (Pozio, 2007).

En la región pampeana de nuestro país, un estudio realizado bajo la dirección del Dr. Regino Cavia en el marco del proyecto “Estudios sobre la ecología de roedores y su rol como hospedadores en sistemas de producción intensiva de bovinos lecheros y porcinos en el centro de la región Pampeana” reveló la presencia de roedores y marsupiales infectados por *T. spiralis* en criaderos de cerdos y tambos de la provincia de Buenos Aires, encontrándose una prevalencia del 3% en *R. norvegicus* (Lovera et al., 2017; Castaño Zubieta et al., 2014).

### La enfermedad en humanos y en cerdos

En humanos, la triquinosis es una enfermedad aguda y crónica cuya única vía de contagio es mediante el consumo de carne infectada cruda o mal cocida. Todas las especies encapsuladas son altamente patogénicas para el hombre, siendo *T. spiralis* la más importante por tener una mayor producción de larvas por hembra (Foreyt, 2013).

La presentación clínica de la enfermedad varía según la cantidad de larvas infectivas consumidas, el tipo de *Trichinella* involucrado y factores individuales del hospedador, como edad, sexo y situación inmunológica. Generalmente, los síntomas aparecen entre la primera y la sexta semana post infección y se reconocen tres etapas dentro de la misma: fase intestinal, migración o fase de invasión de la mucosa, y la fase parental o de convalecencia (Foreyt, 2013).

Durante la fase intestinal, los síntomas son diarrea, náuseas, dolor abdominal y vómitos. Esto es debido al movimiento de las larvas dentro del epitelio intestinal. Muchas veces se mal diagnostica a los pacientes en esta etapa ya que la sintomatología presentada coincide con otras enfermedades gastrointestinales como podrían ser intoxicación por consumo de alimentos en mal estado o trastornos intestinales.

La segunda fase involucra el ingreso de las larvas al sistema circulatorio y su posterior migración a través de tejidos. Las consecuencias de ese movimiento son edemas, por el daño en el tejido circulatorio, problemas para caminar, dolor al respirar y dificultades para masticar o tragar. La razón de esta sintomatología es que las larvas tienen preferencia por los músculos del masetero, de la lengua, diafragma, laringe e intercostales ya que son tejidos de alta actividad y con bajas tasas de producción de glucógeno. En casos muy severos, las larvas pueden invadir tejido cardíaco y neural siendo estos casos los que pueden tener como desenlace la muerte del paciente.

La última etapa, la fase parental o de convalecencia, implica que las hembras adultas dejan de producir larvas y que finaliza el enquistamiento de las que ya se encontraban en circulación. En general los síntomas se reducen, aunque algunos pacientes pueden continuar con pérdidas de peso o decaimiento general.

En lo que respecta al tratamiento de la enfermedad, no existen medicamentos o procedimientos específicos. Se busca aliviar la sintomatología de los pacientes recomendándose la aplicación de antihelmínticos y glucocorticoides (Dupouy-Camet et al., 2007).

Los cerdos si bien son los hospedadores habituales de la *Trichinella*, raramente muestran síntomas por lo que no se recomienda la elección del análisis clínico como método de

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

diagnóstico para la especie (Ribicich 1999). Por este motivo es que los análisis inmunológicos y las digestiones post mortem cobran importancia. Sin embargo, a pesar de la falta de evidencia clínica durante el proceso infectivo, la ganancia de peso (factor clave en la producción porcina) si se ve afectada a partir del día 40 post infección según un estudio realizado por la Dra. Ribicich (1999) en el que se comparó la evolución del crecimiento en animales infectados contra un grupo control sin infectar. Los resultados de su estudio indicaron que los cerdos infectados redujeron entre un 20% y 40% su crecimiento, mientras que los individuos del grupo control mostraron la típica curva de crecimiento esperado para la especie.

### Diagnóstico en medicina veterinaria

El diagnóstico puede realizarse mediante técnicas directas o indirectas. Las directas consisten en la identificación y visualización de las larvas infectivas enquistadas o libres en músculo estriado (Nöckler, 2007). Estas evaluaciones se realizan post mortem y es importante elegir los tejidos de predilección de las larvas. La triquinoscopía por compresión y la digestión artificial son las metodologías empleadas dentro de esta categoría.

La triquinoscopía se encuentra en desuso por su baja sensibilidad (3 LPG en sitios de predilección) y por el tiempo que implica su realización. Consiste en tomar pequeñas láminas de tejido y colocarlas entre dos soportes de vidrio, procurando que queden lo más traslucido posible para luego observar bajo microscopio la presencia de larvas.



**Fig. 4** Vista de una triquinoscopía al microscopio (10X) de tejido muscular con larvas enquistadas.

La Digestión Artificial Rápida (DAR), de mayor sensibilidad (1 LPG para 5 g de muestra), consiste en la liberación in vitro de las larvas enquistadas en las muestras de músculo. Esta técnica permite la detección temprana de las infecciones, desde 17 días post infección. El Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria (SENASA) aprueba únicamente este método para el diagnóstico en plantas de faena para el posterior envío a consumo.

Sin embargo, en animales silvestres pequeños presenta ciertas limitaciones dado que su sensibilidad disminuye con muestras de pequeño tamaño, con cargas parasitarias bajas y es función, además, del tipo de músculo disponible. En animales pequeños, como los roedores, el uso de pools de muestras imposibilita el diagnóstico individual, por lo que la digestión artificial debe realizarse para cada individuo separadamente resultando un proceso lento. Ésta es una de las limitaciones que nos hemos encontrado en los estudios

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

sobre el papel de los roedores y otros animales silvestres en el ciclo de transmisión de *Trichinella spiralis* (Lovera et al., 2017; Montes de Oca et al., 2018).

Por otro lado, las técnicas de diagnóstico indirectas se basan en la detección de la infección, ante o post mortem, demostrando la circulación de anticuerpos específicos en el hospedador. Se destacan las técnicas serológicas de ELISA y Western Blot.

El ensayo inmuno-enzimático “Enzyme Linked Immunosorbent Assay” o test de ELISA se basa en el uso de antígenos específicos del parásito y anticuerpos secundarios marcados con una enzima. Los conjugados resultantes tendrán por consiguiente actividad tanto inmunológica como enzimática por lo que a través de un proceso de revelado específico producirá un color observable a simple vista y cuantificable por un lector de densidad óptica (Ruiz, 2007).

La técnica de ELISA tiene como características principales ser de alta sensibilidad, especificidad, rapidez, y economía. Producto de su sensibilidad, permite identificar animales positivos con infecciones bajas de 0,01 larvas por gramo de músculo (Ruiz, 2007).

En caso de obtener un ELISA positivo se debe confirmar el resultado mediante la técnica de Western Blot. Dicha técnica posibilita la identificación de bandas polipeptídicas específicas localizadas entre 42 a 60 KDa en membranas de nitrocelulosa.

La realización de pruebas serológicas posibilita la identificación de la enfermedad en sueros de animales aún en pie, por lo que resulta sumamente útil en programas de control en establecimientos. A su vez, representa una herramienta muy útil en estudios epidemiológicos de animales silvestres.

La metodología indirecta, recomendada y utilizada para la detección de diversos patógenos de importancia veterinaria, permitirá también diagnosticar en forma indirecta la presencia de la infección en roedores silvestres haciendo más eficiente el estudio del estado de la infección en explotaciones porcinas, a partir de la infestación en la fauna circundante.

Existe otra herramienta, una vez aislada la larva infectante, que es el diagnóstico molecular. Dicho análisis nos permite categorizar a nivel de especie o genotipo dicha larva; para esto se realiza el procedimiento de reacción en cadena de polimerasa Nested-Multiplex PCR (Zarlenga et al., 1999) que detecta ADN del parásito con una sensibilidad de 0,001 LPG.

**Tabla 1:** Resumen de la sensibilidad de los diferentes métodos diagnósticos.

Técnica de diagnóstico (tamaño de muestra)	Sensibilidad de la técnica
Triquinoscopía (1 g / animal)	Mayor a 3 larvas / g de músculo
Digestión Enzimática (5 g / animal)	Menor a 0,1 larva / g de músculo
Test de ELISA (suero)	Menor a 0,01 larva / g de músculo

Medidas de control en cría de cerdos

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

A nivel general se consideran cinco puntos principales recomendados por la Comisión Internacional de Trichinellosis a tener en cuenta a la hora de evaluar un establecimiento porcino (Gambel et al., 2007):

1. Construcción e instalaciones: la idea es que las construcciones se encuentren diseñadas para que los animales estén alejados de los roedores. El beneficio a su vez es aislar de otros factores externos que tienen incidencia en los resultados productivos, como son los cambios bruscos de temperatura, humedad y corrientes de aire, ya que los cerdos poseen altos requerimientos ambientales. El control de roedores en estos casos se debe realizar controlando las posibles vías de ingreso como son ventilaciones, rejillas, aberturas, etc.

Otro factor a tener en cuenta es el control perimetral del galpón o sitio donde se encuentran los animales, intentando eliminar posibles madrigueras o aislar lugares donde puedan habitar roedores, ya sea cómo basurales, composteras para cadáveres y otros residuos, etc.

2. Alimentación: tener un control sobre los silos, las fuentes de procedencia del alimento o en situaciones donde se den desperdicios a los animales, procurar la realización de un tratamiento térmico apropiado para eliminar posibles focos de infección.

3. Control de roedores: mantener registro de la frecuencia del control de roedores. Realizar recorridas para identificar señales como grasitud en paredes, excrementos, etc., que indiquen la presencia de estos individuos.

4. Higiene del establecimiento: en este punto se integra el manejo de los cadáveres y asegurarse que no haya basurales a un radio de 2 km de la granja.

5. Animales nuevos: controlar procedencia, hacer análisis serológicos, respetar los períodos de cuarentena y mantener registros individuales.

Lamentablemente el problema principal es que las medidas anteriormente descriptas rara vez se cumplen en producciones de pequeña escala, por falta de recursos ya sea económicos como educacionales. Por este motivo es que las principales acciones que se buscan tomar son en primer lugar generar conciencia y en segundo lugar poder empoderar a los pequeños productores dándoles herramientas básicas, adaptadas a su tipo de sistema, para poder evitar la perpetuación del ciclo del parásito.

El SENASA, mediante la resolución 555/2006, estableció una serie de medidas para el control de la triquinosis con el objetivo de proteger y aumentar la salud humana y la sanidad animal. En dicha resolución se aprueba el "Programa de control y erradicación de la triquinosis porcina en la República Argentina".

El programa tiene como objetivo poder brindarle al productor lineamientos básicos sobre manejo de factores como alimentación e infraestructura de los establecimientos, generación de conciencia en lo que respecta a la transmisión de la enfermedad y sus consecuencias, regular y desalentar las faenas clandestinas, promover el acompañamiento veterinario y la realización de procesos diagnósticos.

El plan se ejecuta desde el estado a nivel nacional, gubernamental y a nivel de los partidos. El objetivo es lograr una interacción entre la población, asociaciones dentro de la industria

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

y los organismos estatales para poder trabajar integrando todos los eslabones de la cadena.

Por lo tanto, los aportes que se puedan realizar desde este proyecto podrán ser aplicados en aspectos de la sanidad animal, ya que se espera contribuir con el conocimiento de esta patología y colaborar en el establecimiento de programas de control y erradicación de esta enfermedad en nuestro país.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## **HIPÓTESIS**

Actualmente, el diagnóstico de triquinosis en cerdos se realiza mediante la técnica de digestión artificial (DAR). La misma se utiliza también para el diagnóstico de otros animales domésticos y silvestres. Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones para tamaños de muestras pequeños y la detección individual del parásito con volúmenes de muestras grandes se vuelve muy lenta.

Es por eso que en este trabajo aplicamos también la técnica serológica de Western Blot (WB) para detectar en forma indirecta la presencia de la infección en ratas silvestres, esperando encontrar un mayor número de animales infectados por esta técnica que por DAR, como así también encontrar un número mayor de ratas infectadas en establecimientos familiares que en establecimientos comerciales debido a las técnicas de manejo empleadas.

## **OBJETIVO**

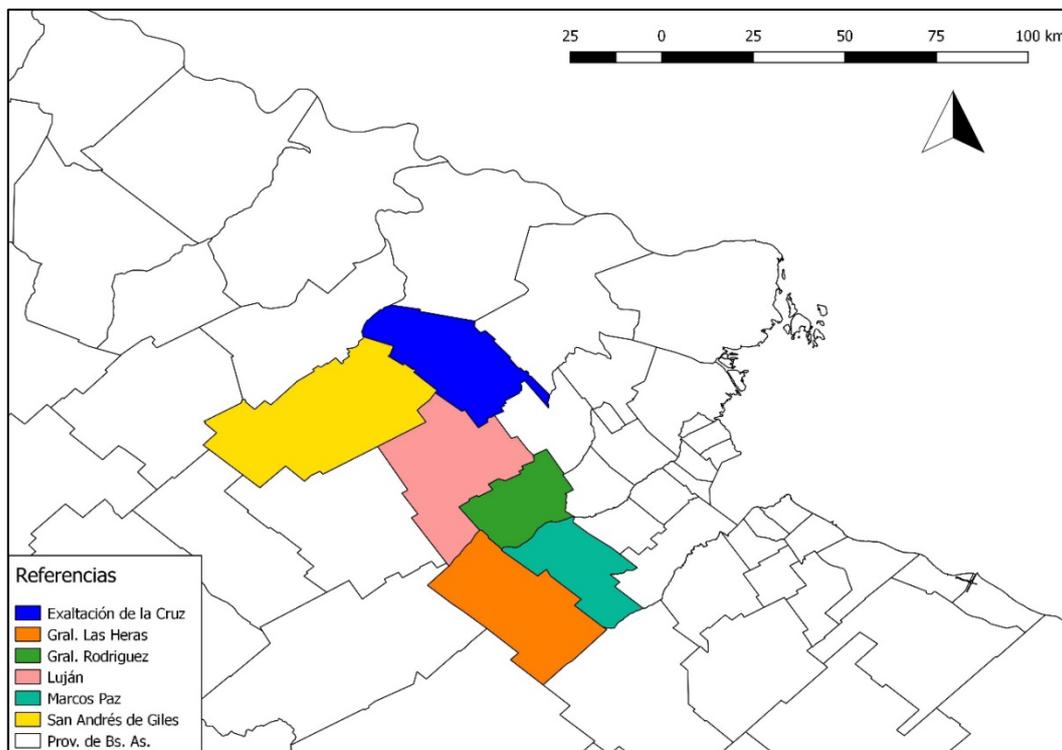
El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires, a través del método directo Digestión Artificial Rápida y el método indirecto Western Blot.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## MÉTODOS Y MATERIALES

### Obtención de las muestras

Se utilizaron 347 muestras totales, 95 fueron analizadas por las técnicas de Digestión Artificial Rápida (DAR) y Western Blot. Por otra parte, 236 solo por DAR y 16 solamente por WB. Esto nos da un total de 331 muestras analizadas por digestión y 111 por WB. Los muestreos fueron realizados por el Dr. Regino Cavia y su equipo del Laboratorio de Ecología de Poblaciones, Departamento de Ecología, Genética y Evolución (FCEN - UBA), entre los años 2010 y 2018, en las localidades de San Andrés de Giles, Gral. Las Heras, Marcos Paz, Luján, Exaltación de la Cruz y Gral. Rodríguez, como se muestra en la figura a continuación.



**Fig. 5** Mapa de la provincia de Buenos Aires con las localidades implicadas en el muestreo resaltadas. Elaborado con el programa QGIS 2.18.13

Se realizaron cuatro muestreos por año utilizando trampas de captura viva tipo jaula (12,5 × 12,5 × 40 cm) y tipo Sherman (8 × 9 × 23 cm). Los cebos utilizados fueron, en el primer caso, avena, grasa bovina y manteca de maní, y en el segundo caso, un trozo de carne o grasa vacuna y zanahoria. Las jaulas fueron ubicadas en puntos estratégicos de los establecimientos como construcciones humanas, galpones de cría o de almacenamiento de alimentos, durante tres noches consecutivas.

En cada lugar se dispusieron de dos a tres transectos de trampeo, de 50 o 100 metros cada una, en función de la extensión del ambiente donde se colocaron. Ambos tipos de trampa fueron ubicados cada 5 metros y en forma alternada.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Los ejemplares capturados fueron determinados específicamente, medidos, sexados y se asentó registro de la fecha y localización de la captura. La manipulación de estos se realizó de acuerdo con lo establecido en la Ley Nacional 14346 que describe qué tipo de actos son considerados como crueles o de maltrato para con los animales.

Una vez capturados, los individuos fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical, en el caso de los roedores. Los animales de otras especies capturadas se sacrificaron con una sobredosis de anestesia quirúrgica Ketamina-Acedan vía intramuscular. En todos los casos se extrajo muestras de músculo, con preferencia de diafragma, músculos intercostales y lengua, y suero que se utilizaron en los análisis posteriores. En ciertos casos la muestra que se extrajo de músculo fue insuficiente por lo que no se realizó Digestión Artificial en esas situaciones.

Las muestras obtenidas fueron conservadas a 4 °C durante la realización del muestreo y luego almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

En lo que respecta al manejo de residuos biológicos, se embolsaron en doble bolsa roja, ajustada por un precinto de seguridad y descartados en FCEN - UBA según indicaciones de la Secretaría de Higiene y Seguridad de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

Se aclara que todo el material que fue utilizado recibió un tratamiento de desinfección con agentes neutralizantes y que los investigadores que manipularon los individuos utilizaron la vestimenta de seguridad apropiada para evitar el contacto con aerosoles o secreciones de los roedores como es descripto por Gómez Villafañe (2005) en la Guía de roedores de la provincia de Buenos Aires.

### **Diagnóstico directo de triquinosis por la técnica de digestión enzimática artificial (DAR)**

La aplicación de la técnica de digestión enzimática artificial se realizó en función de lo establecido en la Resolución N° 740/99. La misma detalla la técnica de diagnóstico para la *Trichinella spiralis* en carnes porcinas para consumo, y los requisitos con respecto a la forma de muestreo exigidos por el SENASA.

Para la realización de la técnica de digestión se realizó en primer lugar un acondicionamiento de las muestras, triturándolas con tijera y pinza (Fig.6 A). Las mismas fueron pesadas en balanza y colocadas en un vaso de precipitado. Se trabajó con muestras con pesos entre 5 y 7 g.

En función de lo establecido en la resolución de SENASA se utilizó una relación de muestra de tejido muscular-líquido de digestión de 1:15. El líquido de digestión está compuesto por agua destilada, 1% de pepsina (PROQVIT®) 1:10000 NF y 1% de ácido clorhídrico fumante (EMSURE®) 37%. A modo de ejemplo se presenta el siguiente caso de cómo se calculó la cantidad y proporciones de líquido:

#### Ejemplo

Si la proporción de tejido muscular / líquido de digestión es de 1:15, para una muestra de 20 g:

$$20 \text{ g} \times 15 = \boxed{300 \text{ ml}} \longrightarrow \text{Volumen de líquido de digestión}$$

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

100% —→ 300 ml

1% —→ x = 3 ml HCl 37% fumante / 3 g de pepsina 1:10000

Finalizados los cálculos, se pesó en balanza la cantidad de pepsina requerida y se la espolvoreó sobre la carne (Fig. 6 B). Luego, se agregó en el vaso de precipitado el agua destilada a una temperatura de entre 44 °C y 46 °C y el ácido clorhídrico fumante 37%. Se aclara que, por protocolos de seguridad, el manejo del ácido siempre debe realizarse bajo campana para evitar el contacto directo con los vapores que emana el mismo. A modo de control, se midió el pH, el cual debe estar comprendido entre 1,5 y 2.



**Fig. 6** A) (izquierda) Acondicionamiento de las muestras mediante trituración mecánica. // B) (derecha) Espolvoreado de la pepsina (PROQVIT) 1:10000 sobre la muestra.

Como paso final de la preparación de las muestras, se colocó una barra magnética en el vaso de precipitado y se cubrió con una hoja de aluminio.

Para dar inicio al proceso de digestión, que lleva 45 minutos aproximadamente, se colocó el vaso de precipitado en una placa térmica con agitador magnético. Mientras se llevó a cabo este paso, se aseguró que las muestras permanecieran en todo momento a una temperatura de entre 44 °C y 46 °C hasta la digestión completa de la muestra, y que el líquido girara a una velocidad adecuada que permita la formación de un remolino central, sin provocarse salpicaduras.



**Fig. 7** Proceso de digestión propiamente dicho.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Finalizado el tiempo de digestión completa de la muestra, el líquido se vertió a una ampolla de decantación a través de un tamiz, de 170 micras, y embudo. Se dejó reposar durante un mínimo de 45 minutos (Fig. 8). El objetivo de este paso es poder recolectar los sedimentos del proceso de digestión que se espera cuenten con las larvas, que debido a su peso específico también decantarán.



**Fig. 8** Líquido de digestión decantando en ampolla.

Seguidamente, se tomó una muestra de 50 ml de líquido de digestión en un tubo graduado. Este volumen extraído representa los sedimentos que han decantado y donde se espera estén las larvas. Se volvió a dejar decantar por 20 minutos para permitir que las posibles larvas presentes en la muestra precipiten.

Concluido ese tiempo, mediante una bomba de vacío se extrajo el líquido sobrenadante hasta alcanzar un volumen de 10 ml (Fig.9). En caso de que el líquido resultante hubiese requerido de una clarificación, se agrega al tubo agua destilada hasta alcanzar nuevamente el volumen de 50 ml, se deja decantar por otros 15 a 20 minutos y luego se realiza la extracción con la bomba otra vez. Este proceso puede repetirse hasta que la solución este lo suficientemente clarificada.



**Fig. 9** Extracción del líquido sobrenadante para obtener un volumen de 10 ml de muestra.

Una vez obtenidos los 10 ml de muestra, se colocó la solución en una cámara cuenta larvas de 6 cm × 3,6 cm y se realizó la lectura de esta como puede verse en la Fig. 10. La cámara está dividida en cuadrados de 3 mm × 3 mm para facilitar el recuento final. El resultado se expresa en larvas/gramo (lpg).

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires



**Fig. 10** Vertido del líquido de muestra en la cámara y posterior lectura en microscopio.

### **Cultivo de larvas del estadio 1 de *T. spiralis* y producción de antígeno secretor (E/S)**

Las larvas utilizadas para la obtención de antígeno E/S a utilizarse en las pruebas serológicas, fueron obtenidas mediante la técnica de Digestión Artificial descrita en la sección anterior.



**Fig. 11** vista de larvas obtenidas mediante la técnica DAR en microscopio óptico a 40X de aumento.

Una vez obtenidas las larvas se procedió a comenzar el proceso de lavaje, para lo cual se colocaron las mismas en tubos cónicos con 40 ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) con antibiótico. A continuación, se las dejó reposar 20 min hasta la total decantación y se descartó el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Finalizado este paso, las larvas fueron resuspendidas en 50 ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y se cuantificaron utilizando un microscopio con aumento 10X, realizando una dilución 1/100 de la suspensión anterior.

Luego, las larvas se llevaron a una concentración final de 5000 L1/ml en medio de cultivo y se sembraron 25 ml de esta suspensión en frascos de cultivo de 75 ml. Se procedió entonces a colocarlos en estufa a 37 °C, con atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, durante 18-20 h. Durante este período de tiempo se ha determinado que la concentración de antígenos excreto-secretorios es mayor.

Una vez que pasaron las 18-20 hs se realizó la decantación del cultivo y se extrajo el sobrenadante, que fue concentrado. Para realizar este último paso, se empleó un proceso de filtración bajo presión discontinua a través de una bomba peristáltica y un cassette (Pellicon XL Dvices) para filtración tangencial con membrana 10.000 Da. El sistema consta de una entrada, donde ingresa el líquido a filtrar, y dos salidas: una para el líquido filtrado (permeado empobrecido) y otra para el concentrado (retenido empobrecido). El volumen final del concentrado fue filtrado con filtros Millipore de 0,22 µm y se lo fraccionó en crioviales. De allí se obtuvieron las proteínas que luego se usaron en la técnica de Western Blot, descripta a continuación.

La cuantificación de la concentración se realizó a través del método de Bradford, utilizando una curva de un estándar proteico de albúmina bovina (BSA) y teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante del reactivo. El mismo consistió en hacer mediciones de las muestras a analizar y una muestra blanco en un espectrofotómetro, el cual arrojó los resultados de las concentraciones en µg/ml.

Para la lectura en el espectrofotómetro, se utilizaron las siguientes cantidades de reactivos:

- Muestra problema: 20 µl de muestra + 400 µl de reactivo de Bradford (SIGMA®) (Brilliant Blue G en ácido fosfórico y metanol) + 90 µl de medio DMEM.
- Muestra control: 400 µl de reactivo de Bradford + 100 µl de medio DMEM

Se aclara que las larvas infectivas obtenidas en el proceso de DAR se utilizaron también para infectar a los ratones que dispone el laboratorio, con el objetivo de mantener el ciclo y mantener la cepa. El laboratorio cuenta con el aval n° 03/2016 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE-INTA CICVyA) para mantener los animales en un bioterio dentro del predio de INTA Castelar.

### **Diagnóstico indirecto de trichinelosis por la técnica de Western Blot**

La técnica de Western Blot consiste en que diferentes componentes proteicos, separados a través de electroforesis, sean transferidos de un gel a un soporte y luego sean probados con reactivos que son específicos para determinadas secuencias de aminoácidos (Sambrook, 2001). Según el mismo autor, es un método sumamente útil en lo que respecta a la identificación y cuantificación proteínas específicas que se encuentran en mezclas complejas.

En lo que respecta a la relación con el diagnóstico de la trichinelosis, el Western Blot permite detectar anticuerpos específicos contra *Trichinella sp.* y permite discriminar entre

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

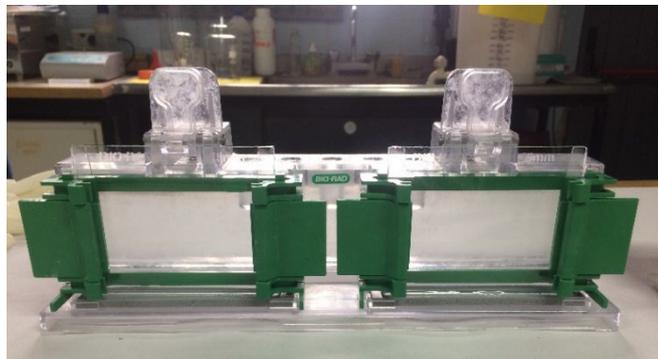
casos con esta enfermedad de los que padecen otras infecciones ocasionadas por helmintos (Yang et al., 2016).

### 1) PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO

La muestra se diluyó con Buffer 4X de BioRad (Laemmli Sample Buffer), en proporción 1:4 (1 parte de buffer, 4 de muestra). A continuación, se dejó hervir durante 3 minutos y luego se procedió a sembrarlo en el gel cuya preparación se explica en el punto 4.2.

### 2) SDS-PAGE

En primer lugar, se limpió con alcohol 70% los vidrios que conforman el soporte del gel de acrilamida procurando que no quedaran residuos o grasitud que podrían interferir con la polimerización del gel y consecuentemente con la corrida electroforética. A continuación, se los colocó en la estructura como se muestra en la Fig.12.



**Fig. 12** Estructura de soporte para los marcos donde se armó el gel de acrilamida.

Para comprobar que la estructura no tenga pérdidas significativas, o sea, que el volumen del gel no descienda, se llenó el vidrio con agua destilada y se controló durante unos minutos si bajaba el nivel. Terminada esta prueba se vació el vidrio sin desarmar la estructura.

En segundo lugar, se prepararon los geles de acrilamida: se distingue entre un gel de base (“running”) y otro superior (“stacking”). Se tomaron en cuenta las siguientes proporciones en función de la cantidad de geles que se desearan preparar:

**Tablas 2 y 3:** proporciones utilizadas para la preparación de los geles de concentración y corrida respectivamente, del antígeno E/S.

Tabla 2

Running 12%		
	1 gel	2 geles
Agua destilada	1,6 ml	3,3 ml
30% Acri/ bis (29:1) BioRad®	2 ml	4 ml
Tris HCl 1.5 M pH 8,8	1,3 ml	2,5 ml

Tabla 3

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

SDS 10%	50 µl	100 µl	Stacking		
				1 gel	2 geles
APS	50 µl	100 µl	Agua destilada	0,68 ml	1,4 ml
TEMED	2 µl	4 µl	30% Acri/ bis (29:1) BioRad®	0,17 ml	0,33 ml
			Tris HCl 1.5 M pH 6,8	0,13 ml	0,25 ml
			SDS 10%	10 µl	20 µl
			APS	10 µl	20 µl
			TEMED	1 µl	2 µl

Se preparó en primera instancia el gel de base en función de las proporciones descriptas anteriormente en la tabla 1 y con una pipeta se colocaron aproximadamente 1000 µl hasta que se completó 1 cm por debajo la línea del peine. Para asegurar que no quedaran burbujas, que podrían haber afectado la siembra de antígeno y su posterior corrida, se llenó con agua destilada hasta el tope del marco para poder eliminarlas. Se dejó solidificar durante 30 min en una superficie nivelada.

Una vez que el gel base solidificó, se eliminó el agua excedente, se agregó el gel superior o "stacking" y se colocó el peine que divide la zona de siembra del patrón de peso molecular conocido, y la del antígeno. Se dejó solidificar por 10-15 minutos aproximadamente.

Finalizado la realización del gel de soporte se procedió a dar comienzo a la siembra y a la corrida electroforética. Para este proceso se colocó en una cubeta de corrida, la estructura en su correspondiente soporte y se llenó con buffer de corrida (25 mM Tris, 250 mM Glicina y 0,1 % SDS) en el compartimento externo e interno. Con mucho cuidado se retiró el peine y se procedió a sembrar en el espacio más grande 50 µg de la muestra de antígeno, que fue acondicionado como se describió anteriormente, y en el espacio más pequeño se agregó 10 µl del patrón o marcador de peso molecular de proteínas (MWM) (Thermo Scientific®) (PageRuler Prestained Protein Ladder), de 10 kDa - 170 kDa. Se conectó la fuente de poder y se programó una corrida de 120 min a 100 volts.

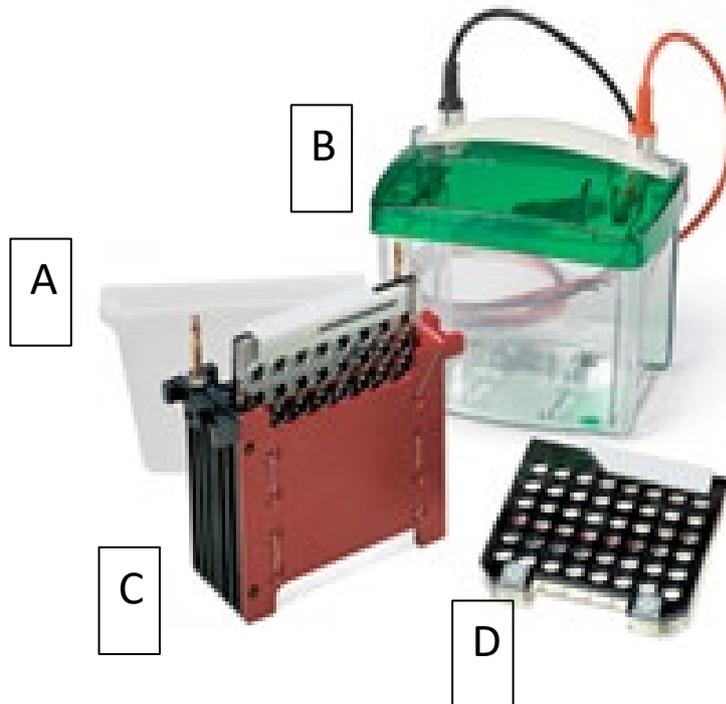
Una vez terminada la corrida, con mucha precaución se retiró el gel de los vidrios soporte y se lo dejó en un recipiente con buffer de transferencia (24 mM Tris Base, 192 mM Glicina, 20% Metanol) para evitar que se seque y se equilibre en el nuevo buffer.

### 3) TRANSFERENCIA ELECTROFORÉTICA

Para la transferencia electroforética se prepararon en primer lugar las membranas de nitrocelulosa (BioRad® Trans Blot Transfer Medium) (poro 0,2 µm). Dichas membranas se recortaron en rectángulos de 7,5 cm × 10 cm, coincidentes con el tamaño del gel, y se dejaron reservadas en un recipiente con buffer de transferencia por algunos minutos. A su vez, se dejó humedeciendo en otro contenedor el papel secante y almohadillas de soporte (esponjas) que forman parte de la estructura que participa en la corrida.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

En la siguiente figura se pueden ver los elementos que conforman la estructura para la corrida.



**Fig. 13** A) Refrigerante. B) Cuba de corrida. C) Módulo central con electrodos (Trans-Blot Central Core). D) Contenedor del gel (Gel Holder Cassette).

En función de las recomendaciones del fabricante (BioRad®), se preparó el contenedor del gel en el siguiente orden: polo negativo (lado negro), almohadilla de soporte (esponja), papel secante, gel, membrana de nitrocelulosa hidratada, papel secante, almohadilla de soporte y finalmente el polo positivo (lado transparente).

Se tomó la precaución de asegurarse que no quedaran burbujas entre la membrana y el gel que pudieran interferir con el resultado de la transferencia.

Los soportes listos fueron encastrados en la estructura del módulo central y el mismo fue colocado en la cuba de corrida. Se colocó a su vez un refrigerante y se llenaron los espacios de la cubeta con buffer de transferencia. La fuente de energía se colocó a 70 volts durante 120 min.

Finalizado ese tiempo, se retiró la membrana y se la reservó para el siguiente paso. El gel fue descartado.

#### 4) BLOQUEO Y ADICIÓN DE MUESTRAS

La membrana ya transferida se dejó incubando con PBS-Tween Leche (leche en polvo descremada al 8% en PBS-Tween) 5 horas, en agitación, a 20 °C.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Finalizado el tiempo de bloqueo, se realizaron tres enjuagues con PBS-Tween (500 ml de PBS y 1 ml de Tween de la marca Promega®) y se dividió la membrana en diferentes bandas las cuales fueron colocadas en cubetas separadas. A cada tira de membrana se la identificó numéricamente y se le colocaron los sueros a analizar diluidos 1/100 en PBS-Tween Leche. Se las dejó durante toda la noche en incubación a 4 °C con agitación.

Una vez pasado ese tiempo, se lavó individualmente las tiras con PBS Tween 5 veces, en intervalos de 5 a 10 minutos con agitación. Concluido este proceso, se agregó el conjugado anti rata o anti ratón según corresponda en una dilución 1/1000 en PBS Tween Leche y se incubó 1 h a 37 °C en agitación. Luego se realizaron lavados 5 veces con PBS Tween y seguidamente se procedió al revelado.

## 5) REVELADO

Se utilizó el kit AEC CHROMOGEN de la empresa SIGMA®. Las bandas fueron colocadas en recipientes y se les agregó las soluciones provistas por el kit. Se dejaron unos minutos en agitación hasta que se visualizaron bandas. Para detener la reacción se colocaron las tiras en agua destilada.

## Genotipificación de larvas

En aquellas muestras estudiadas donde se encontró al menos una larva a través de la técnica DAR, se realizó una genotipificación con el objetivo de determinar especie y género.

### 1) AISLAMIENTO DE ADN

El ADN genómico se extrajo a partir de una digestión individual según el protocolo descrito por Zarlenga (1999). Se agregó 15 µl de PCR buffer (Promega GoTag® DNA Polymerase 5x Colorless) a las larvas que fueron separadas individualmente. Al conjunto se lo calentó a 90 °C por 10 minutos y luego se redujo la temperatura a 65 °C.

A continuación, se ajustó el volumen a 10 µg/ml con Proteínasa K (AMBION® Concentración inicial 20 mg/ml, 0,5 unidades/µl). Se agregó, para evitar la evaporación del contenido del tubo, una gota de aceite mineral (Biodynamics®). Finamente se dejó incubar durante 3 horas a 65 °C. La Proteínasa K se inactivó elevando la temperatura de reacción a 90 °C durante 15 minutos

Para la determinación de la concentración de ADN se realizaron mediciones usando un espectrofotómetro.

### 2) NESTED PCR

Bajo campana, previa desinfección durante 10 min con luz U. V. de la superficie y el equipo a utilizar, se preparó la solución que se le agregó a las muestras para comenzar la PCR. Se utilizaron los siguientes componentes: agua, Mix o Reaction Buffer (PROMEGA GoTaq® Green Master Mix), y los primers (sintetizados por Ruralex®) descritos en la Tabla 4.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Tabla 4: detalle de los primers utilizados en la reacción.

Par del Primer	Ubicación en el ADN	Secuencia
NE Forward	ESV*	5'-TCTTGGTGGTAGTAGC
Reverse		5'-GCGATTGAGTTGAACGC
NI Forward	ITS**	5'- AAAGGAATTCAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG
Reverse		5'-AAATCTAGATTAGTTTCTTTTCCTCCGC

\*Segmento de expansión V.

\*\* Espaciador transcrito interno.

Las cantidades de cada componente se calcularon de acuerdo a lo descrito en la tabla n°5:

**Tabla 5:** proporciones para la preparación de la solución que acompañó la muestra amplificada.

	X = 1 muestra (µl)
H <sub>2</sub> O	4.4
Mix 2X	10
Ne Forward [0.05 µM] <sub>F</sub>	0.1
Ne Reverso [0.05 µM] <sub>F</sub>	0.1
Ni Forward [0.01 µM] <sub>F</sub>	0.2
Ni Reverso [0.01 µM] <sub>F</sub>	0.2

Aclaremos que a modo de control se preparó una muestra negativa es decir, sin material genético.

Una vez que se separó en tubos individuales la solución y se agregaron 4 µl de las muestras de ADN extraídas sobre la mesada, previamente desinfectada con alcohol 70%. A continuación, se colocaron los tubos dentro del aparato termo ciclador para dar comienzo al proceso de ciclos. Según Zarlenga (1999), las condiciones de los ciclos de PCR fueron: un ciclado inicial que se basa en la apertura o desnaturalización de las cadenas de ADN a 95 °C durante 5 minutos, y luego se procede a ciclos de 94 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 2 min, por 25 repeticiones. Finalmente, el último ciclo que se realiza para que se terminen de completar y cerrar las cadenas abiertas es durante 7 minutos a 72 °C.

### 3) MULTIPLEX PCR

A los productos resultantes de Nested PCR, se les realizó una nueva amplificación a través de la Multiplex PCR.

Nuevamente bajo campana, previamente desinfectada con alcohol 70% y esterilizada durante 10 min con luz UV. la superficie y el equipo a utilizar, se preparó la solución que se le agregó a las muestras para comenzar la PCR. Los componentes utilizados fueron:

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

agua, mix (PROMEGA GoTaq® Green Master Mix), y primers (sintetizados por Ruralex®), descritos en la tabla n° 6.

**Tabla 6:** Detalle de los primers utilizados en la reacción.

Par del Primer	Ubicación en el ADN	Secuencia
I	ESV*	5'-GTTCCATGTGAACAGCAGT
		5'-CGAAAACATACGACAACTGC
II	ITS 1**	5'-GCTACATCCTTTTGATCTGTT
		5'-AGACACAATATCAACCACAGT CA
III	ITS1	5'-GCGGAAGGATCATTATCGTGTA
		5'-TGGATTACAAAGAAAACCATCA CT
IV	ITS 2**	5'-GTGAGCGTAATAAAGGTGCAG
		5'-TTCATCACACATCTTCCACTA
V	ITS 2	5'-CAATTGAAAACCGCTTAGCGTG TTT
		5'-TGATCTGAGGTCGACATTTC

\*Segmento de expansión V.

\*\* Espaciador transcrito interno 1 y 2.

Las proporciones de cada componente se calcularon teniendo en cuenta las proporciones descriptas en la tabla n° 7:

**Tabla 7:** proporciones para la preparación de la solución que acompañó la muestra amplificada.

	X 1 muestra (µl)
H <sub>2</sub> O	5,75
Mix 2X	12,5
PAR I (Forward y Reverso) [0.25 µM] <sub>F</sub>	0,625
PAR II (Forward y Reverso) [0.25 µM] <sub>F</sub>	0,625
PAR III (Forward y Reverso) [0.25 µM] <sub>F</sub>	0,625
PAR IV (Forward y Reverso) [0.5 µM] <sub>F</sub>	1,25
PAR V (Forward y Reverso) [0.25 µM] <sub>F</sub>	0,625

Sobre la mesada ya desinfectada, se agregó a cada tubo 3 µl de la correspondiente muestra proveniente de la Nested PCR. Junto con el control negativo que se utilizó en la

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Nested PCR, se agregó para esta nueva amplificación controles positivos correspondientes a *Trichinella spirallis* y *T. patagoniensis*. Luego, se procedió a colocar en el termo ciclador. En función de lo descrito por Zarlenga (1999), el régimen de ciclos en este caso fue de: desnaturalización inicial a 94 °C, 5 min seguido de 40 ciclos sucesivos de 94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 2 min y extensión final a 72 °C, 7 minutos.

#### 4) CORRIDA ELECTROFORÉTICA

A los productos obtenidos luego de la Nested PCR y la Multiplex PCR se los sembró en geles de agarosa al 2,5% y se realizó la corrida electroforética para poder separarlos. Los volúmenes utilizados para sembrar las muestras fueron de 20 µl. Se aclara que en el esquema de siembra se colocó 2,5 µl de un estándar de ADN de 20 pares de bases (BioRad® PCR Molecular Ruler) para tener como referencia. Los geles fueron colocados en una cuba de corrida y se les agregó como líquido de corrida TBE (90 mM Tris borato y 2 mM ácido etilén di amino tetra acético). La corrida se realizó durante 1,5 horas a 70 volts.

Finalizado ese tiempo, se tiñó el gel con una dilución de bromuro de etidio (PROMEGA® 10 mg/ml) con una concentración de 0,5 mg/µl, y se procedió a la visualización del gel bajo luz UV.

#### 5) SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos que amplificaron luego de la Multiplex PCR fueron enviados a la Unidad de Genómica de INTA Castelar, siguiendo los protocolos de acondicionamiento y despacho provistos por la unidad. Este laboratorio está organizado bajo la Norma IRAM 301 ISO/IEC 17025:2005, según el requerimiento del PEI 2005.2015 de INTA y acredita sus ensayos bajo esta norma.

La Secuenciación de ADN se realizó por el método de Sanger en electroforesis capilar y se utilizó un protocolo modificado de Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). El equipo utilizado por el laboratorio es el Secuenciador 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

A los resultados remitidos por la Unidad de Genómica se los procesó en primer lugar con el programa BioEdit v7.0.5 y luego con el programa Blast® Se pudo comparar la secuencia obtenida con la información depositada en el GenBank.

### **Análisis estadístico y espacial**

A continuación, se menciona los análisis estadísticos y espaciales que se utilizaron para la comprobación de los supuestos a lo largo del trabajo.

#### 1) TEST EXACTO DE FISHER Y ANÁLISIS DE CONCORDANCIA

Utilizando el programa Statistix 8 es que realizamos los análisis del Test Exacto de Fisher y de Concordancia en función de los datos recopilados durante la realización de las técnicas de diagnóstico de la enfermedad mencionadas anteriormente.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

La prueba exacta de Fisher, según Balsarini (2008), permite probar una hipótesis de independencia y asegura que la distribución de las frecuencias observadas no depende de ningún otro parámetro desconocido.

Mediante el Análisis de Concordancia se obtuvo el Índice kappa que mide la concordancia entre variables categóricas, ajustando el efecto del azar (Carletta, 1996).

## 2) ANÁLISIS ESPACIAL

Se utilizó el software SatScan versión 9.6 para Windows con el objetivo de realizar el análisis de agrupamiento espacial que consiste en determinar si existen áreas, denominadas clusters, donde se agrupen la mayor cantidad de casos positivos.

Se asume que las muestras responden a una distribución Bernoulli, es decir de presencia o ausencia del parásito en las muestras analizadas, y se fijó un radio máximo de las ventanas en un 50% del área de estudio. Para la obtención de la razón de probabilidades y el p valor se utilizó el método de Monte Carlo.

La visualización de los resultados provenientes del análisis espacial fue graficada mediante el uso del software QGIS 2.18.13.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## RESULTADOS

### Análisis descriptivo

#### ESPECIES Y NÚMERO DE MUESTRAS POR ESPECIE

En la siguiente tabla se describen las especies capturadas y la cantidad de muestras totales de cada una que se dispuso para la realización de este trabajo.

**Tabla 8:** Especies capturadas durante el muestreo en diferentes establecimientos y el número de muestras recolectadas por especie.

Especie	N muestras por especie
<i>Akodon azarae</i>	16
<i>Didelphis albiventris</i>	7
<i>Lutreolina crassicaudata</i>	2
<i>Mus musculus</i>	74
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	1
<i>Oximycterus rufus</i>	3
<i>Rattus norvegicus</i>	226
<i>Rattus rattus</i>	18
	347

Se analizaron 347 muestras totales de las cuales las especies más abundantes son *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*. A continuación, se presentan imágenes de las ocho especies capturadas en los muestreos.

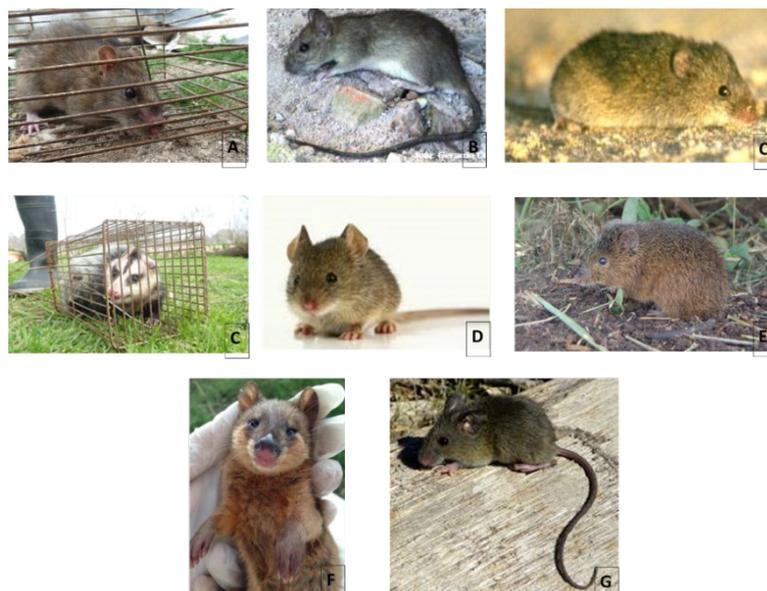


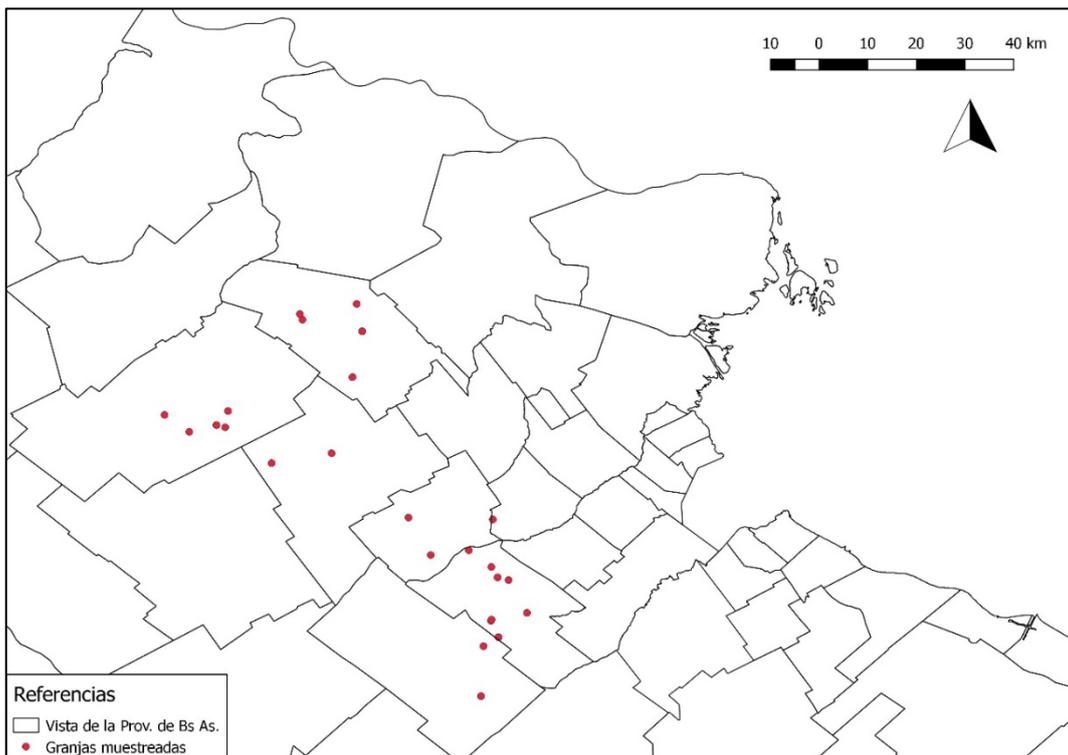
Fig. 14 Fotos de las especies de mamíferos silvestres capturadas en los criaderos de cerdos. a) *Rattus norvegicus*, b) *R. rattus*, c) *Akodon azarae*, d) *Didelphis albiventris*, e) *Mus musculus*, f) *Oximycterus rufus* g) *Lutreolina crassicaudata* y h) *Oligoryzomys*

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

*flavescens* (a, d y g tomadas por Regino Cavia y equipo, las otras imágenes fueron tomadas de internet).

## ESTABLECIMIENTOS

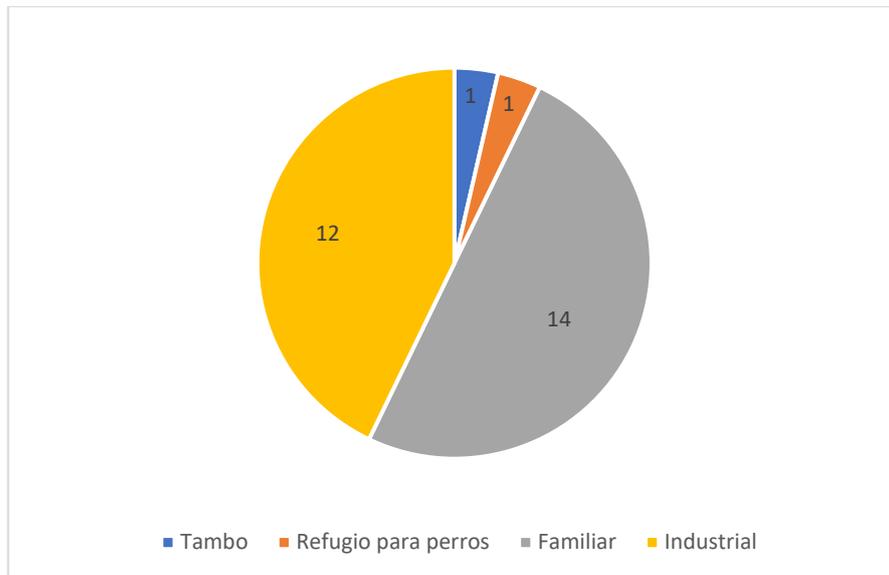
Se tomaron muestras de 28 establecimientos pertenecientes a las localidades de Exaltación de la Cruz, Gral. Las Heras, Luján, San Andrés de Giles, Marcos Paz y Gral. Rodríguez, provincia de Bs. As. En el siguiente mapa se puede observar la localización geográfica de las granjas.



provincia de Buenos Aires donde se muestra la localización geográfica de los establecimientos. Elaborado con el programa QGIS 2.18.13.

Por pedido explícito de los realizadores del muestreo no se puede especificar detalles sobre las granjas más que el tipo de sistema que se practica. Por tal motivo se distingue que en los establecimientos involucrados se practican la cría porcina, en escala familiar o industrial, la actividad lechera y la función de refugio para perros.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

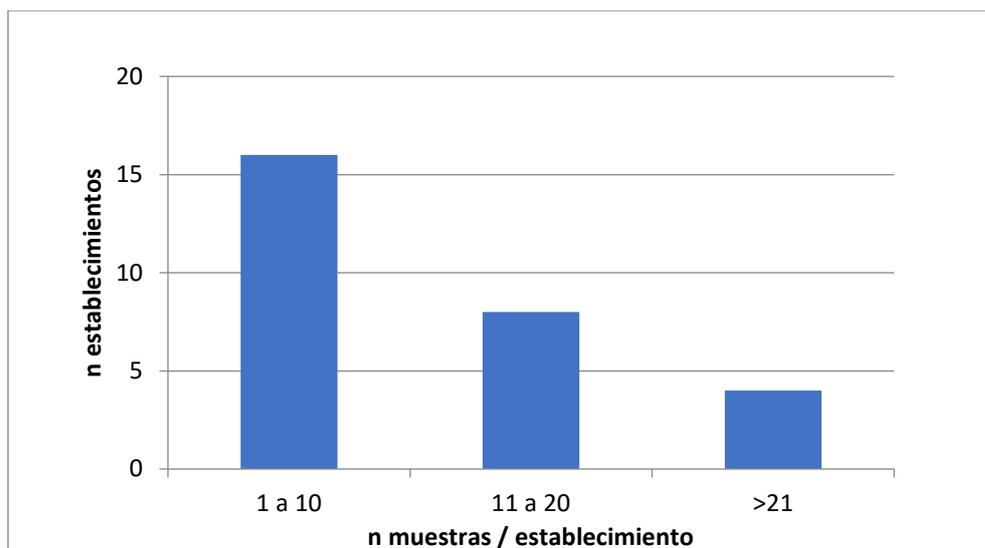


**Gráfico 1:** Número de establecimientos según la escala de producción.

En el gráfico número 1 se puede ver la distribución de establecimientos según cada una de las actividades y escalas mencionadas. Las granjas porcinas a escala industrial son las que predominan en este estudio y le sigue en importancia la escala familiar de producción.

#### MUESTRAS POR ESTABLECIMIENTO

El número de muestras analizadas por cada establecimiento fue seleccionado de manera aleatoria al momento de realizar este trabajo. En el siguiente gráfico se muestra de forma general la cantidad de muestras que se analizaron.



**Gráfico 2:** Muestras analizadas por establecimiento.

Como puede observarse, 16 de los 28 establecimientos poseen entre 1 y 10 muestras analizadas. Solamente 4 granjas poseen más de 21 ejemplares estudiados.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

**Tabla 9:** Número de muestras analizadas en particular en cada establecimiento.

Establecimiento	n muestras	Establecimiento	n muestras
20	12	35	8
21	7	36	2
22	5	37	9
24	2	38	10
25	1	39	16
26	12	40	5
27	6	41	1
28	37	42	14
29	16	43	11
30	2	44	8
31	21	45	5
32	35	46	5
33	33	47	38
34	11	48	15

Total de establecimientos	28
Total de muestras	347

#### DIGESTIÓN ARTIFICIAL RÁPIDA

Según el objetivo planteado para este trabajo se procedió a analizar 331 muestras, de un total de 347, a través del método de análisis directo para triquinosis, la Digestión Artificial.

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos a través de esta metodología de análisis teniendo en cuenta el tipo de producción al que pertenecían las muestras y el número de animales considerados.

**Tabla 10:** resultados obtenidos a través de la técnica de DAR.

Tipo de producción	DAR			
	n animales muestreados	Positivo	Negativo	%

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Criadero de cerdos industrial	192	2	190	0,01
Criadero de cerdos familiar	131	2	129	0,02
Tambo	1	1	-	1,00
Basural (perrera)	7	1	6	0,14
N TOTAL	331	6	325	

Como se puede ver se obtuvieron 6 resultados positivos de las 331 muestras analizadas, presentándose casos en todos los tipos de producción abarcados en el estudio.

#### WESTERN BLOT

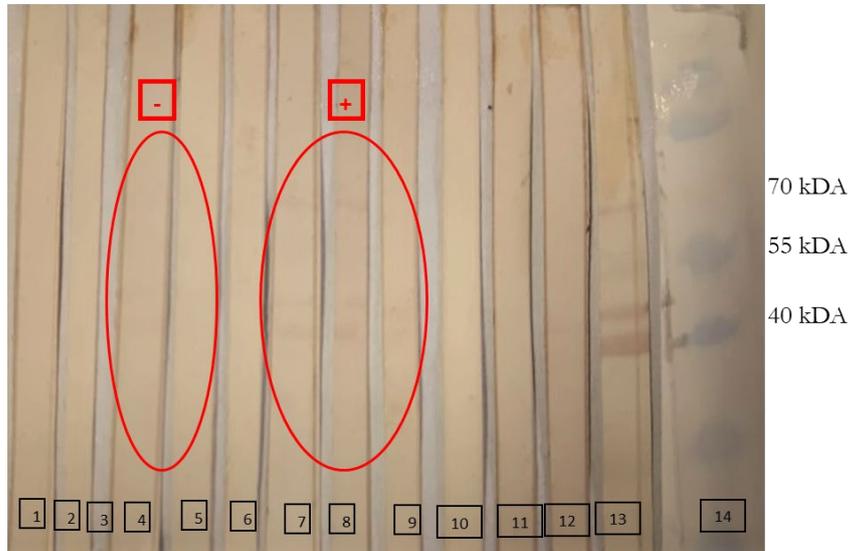
A través del método de diagnóstico indirecto de Western Blot se procesaron 111 muestras obteniéndose un total de 40 resultados positivos como puede verse en la tabla número 11.

**Tabla 11:** Resultados obtenidos a través de la técnica de Western Blot.

Tipo de producción	Western Blot			
	n animales muestreados	Positivo	Negativo	%
Criadero de cerdos industrial	68	23	45	0,34
Criadero de cerdos familiar	38	13	25	0,34
Tambo	2	1	1	0,5
Basural (perrera)	3	3	-	1
N TOTAL	111	40	71	

En la siguiente Fig.16 se puede ver el análisis de 11 sueros de ratas por la técnica de WB.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires



**Fig. 16** Vista de la membrana de nitrocelulosa al momento del revelado y análisis de los resultados (1-11 sueros de rata incógnitas; 12 control negativo; 13 control positivo; 14 MWM).

La Fig. muestra los resultados de muestras incógnita de sueros de rata y su comparación con los controles positivos y negativos. A su vez también se muestra el MWM, a la derecha, que va de 10 kDa a 170 kDa.

La lectura en este caso fue de 8 casos negativos (tiras del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 y 11 en la figura 6) y 3 casos positivos (tiras del 7-9).

### Análisis estadístico

i) Se utilizó el Test Exacto de Fisher para probar hipótesis de independencia entre las técnicas utilizadas y entre los tipos de establecimientos incluidos en el estudio.

A) Diferencia entre técnicas: positivos detectados por DAR vs. WB

En función de las sensibilidades de las técnicas utilizadas (0,1 larva/gramo de músculo en DAR y 0,01 larva/gramo de músculo en WB) se esperaría una mayor cantidad de positivos detectados mediante WB. Por tal motivo es que se analizó la presencia o no de una diferencia significativa entre los casos positivos arrojados por cada técnica utilizada.

1) Hipótesis nula: no existe diferencia entre la proporción de positivos detectadas por ambos métodos.

2) Hipótesis alternativa: existe diferencia entre la proporción de positivos detectados por ambos métodos.

Resultado Test Exacto de Fisher:

P-valor = 0,0000

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Como el P-valor es menor a 0,05 se rechaza la hipótesis nula quedando de manifiesto que existen diferencias entre la proporción de positivos detectada por la técnica directa DAR y la Indirecta WB.

B) Diferencia entre individuos infectados en establecimientos familiares vs. comerciales

Debido a que la presencia del parásito en el medio ambiente está asociada a condiciones precarias de producción, se esperaba que existieran mayor cantidad de individuos infectados en establecimientos familiares. Se analizó entonces la existencia de una diferencia significativa entre los casos de individuos positivos para ambos sistemas.

1) Hipótesis nula: no se espera encontrar un número mayor de roedores infectados en establecimientos familiares que en establecimientos comerciales.

2) Hipótesis alternativa: se espera encontrar una diferencia significativa entre los roedores infectados en establecimientos familiares que en comerciales

Resultado Test Exacto de Fisher:

P-valor = 0,5930

Como el P-valor es mayor a 0,05 se acepta la hipótesis nula. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas en el número de roedores infectados provenientes de sistemas familiares o comerciales.

ii) Análisis de Concordancia

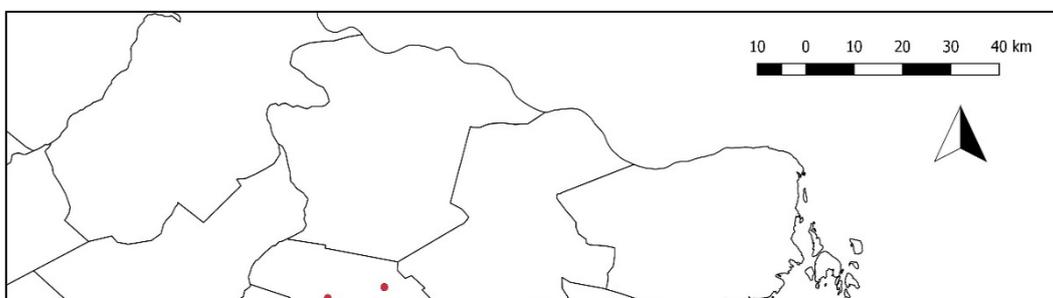
Los resultados del análisis de concordancia entre los casos positivos detectados por ambas técnicas se describen en la tabla a continuación.

**Tabla 12:** Resultados obtenidos por la realización del análisis de concordancia. Elaborado con el software Statistix 8.

ÍNDICE KAPPA	0,047759434
ERROR ESTÁNDAR	0,13086103
IC	95%
FUERZA DE CONCORDANCIA	Pobre

## Análisis espacial

Con el propósito de evaluar si existía algún tipo de agrupamiento entre la ocurrencia de casos positivos, se procedió a realizar un análisis espacial. En la Fig. 17 podemos ver la georreferenciación de los lugares muestreados y los resultados obtenidos.



Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

**Fig. 17** Elaborado con el programa QGIS 2.18.13 según los resultados de SatScan versión 9.6 para Windows.

Se detectaron tres áreas de agrupamientos espaciales (ADE) en la zona de estudio, 2 correspondientes a los positivos detectados por la técnica DAR, y uno correspondiente a los positivos detectados por la técnica WB. A continuación, se describe el análisis de los mismos según la distribución de Bernoulli y la utilización del Método de Monte Carlo para la obtención del p valor.

#### ADE Western Blot

Clusters detectados: 1

Radio del cluster: 8,66 km

Riesgo relativo: 2,15

P valor: 0,76

#### ADE DAR

Clusters detectados: 2

C1

Radio del cluster: 10,34 km

Riesgo relativo: 4,67

Riesgo asociado a la locación: 2,84

P valor: 0,209

C2

Radio del cluster: 9,62 km

Riesgo relativo: 3

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

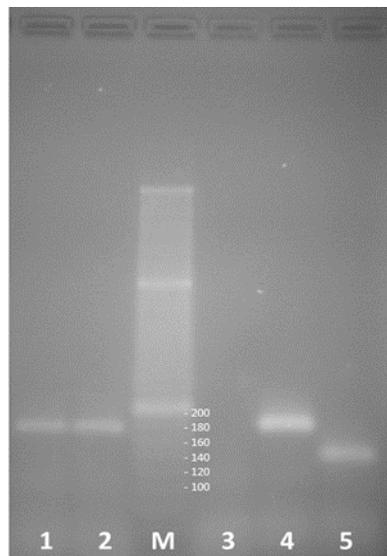
Riesgo asociado a la locación: 1,52

P valor: 0,862

## Genotipificación

En aquellas muestras que resultaron positivas a la técnica de digestión artificial se procedió a extraer las larvas presentes y realizarles los procedimientos pertinentes descriptos en métodos y materiales para poder determinar si se trataba efectivamente de alguna especie de *Trichinella*.

En la Fig.18 podemos ver la vista del gel de agarosa al momento de ser leído luego de la realización de la Nested-Multiplex PCR.



**Fig. 18** Vista del gel de agarosa durante la lectura de los resultados de Nested-Multiplex PCR. Calle 1: muestra de *Rattus norvegicus*; calle 2: *Mus musculus*, 3 Marcador ADN 20 pb; calle 4: control negativo; calle 5: control positivo de *T. spiralis*; calle 6: Control positivo de *T. patagoniensis*.

La lectura de este resultado fue que la banda obtenida para ambas muestras coincidió con el tamaño de la banda amplificada para el control de *T. spiralis*.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

A los productos amplificados se los envió a secuenciar y se realizó el alineamiento respectivo en cada caso, como puede verse en las siguientes figuras.

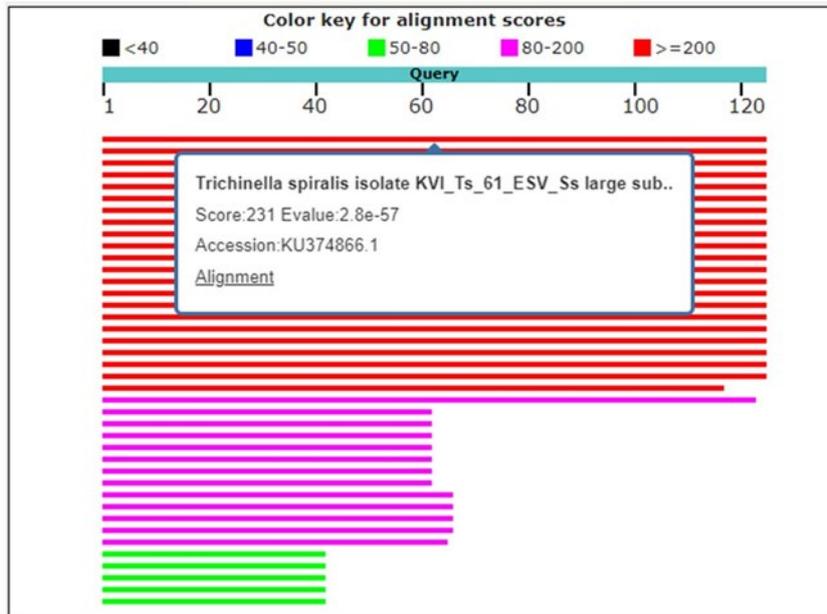


Fig. 19 Secuenciación del producto amplificado



Fig. 20

Alineamiento obtenido mediante el programa BLASTn y CLUSTAL W.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 1) Importancia de los roedores

Como se indicó en los resultados, las especies capturadas fueron *Rattus norvegicus*, *R. rattus*, *Akodon azarae*, *Didelphis albiventris*, *Mus musculus*, *Oxymycterus rufus* *Lutreolina crassicaudata* y *Oligoryzomys flavescens*. Si bien la bibliografía respecto a la ecología de las especies que habitan en nuestra zona de estudio es escasa, se podría afirmar que en las muestras tenemos especies tanto introducidas como autóctonas (Montes de Oca, 2019).

Las especies capturadas más abundantes fueron *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*, lo cual coincide con lo planteado en la literatura para la zona y tipos de producción analizados (Lovera, 2015).

Como se mencionó en la introducción, algunos autores sostienen en clasificarlos como “reservorio” de la enfermedad, mientras que otros “hospedadores accidentales”. Como un objetivo particular dentro del objetivo general planteado, se buscó poder aclarar este supuesto.

Para concluir, sugerimos que los datos analizados no son suficientes como para aceptar o refutar alguna de las teorías sobre el rol específico de estos animales. Sin embargo, es un hecho que los roedores tuvieron una gran presencia tanto en las capturas como en los casos positivos lo cual nos permite afirmar que cumplen una función innegable en el ciclo de transmisión, ya sea como vector o como hospedador accidental, y que el contacto con la enfermedad existe.

En relación con este último punto, se subraya la importancia de la implementación de programas de desratización, controles sanitarios y diseños de infraestructura que separen a los roedores de los animales en producción.

### 2) Detección del parásito

En función de los resultados obtenidos, 6 casos de un total de 331 fueron positivos mediante la técnica de DAR y 40 muestras de 111 lo fueron a través de WB. Cabe destacar que los resultados obtenidos como positivos no coinciden entre evaluaciones en todos los casos, es decir que las muestras positivas para una técnica no fueron para la otra. Mediante el análisis estadístico de Fisher comprobamos que existió una diferencia significativa en los resultados positivos entre ambas técnicas.

Por un lado, estos datos resultan llamativos ya que la técnica de Digestión Artificial es considerada como Gold Estándar, es decir la que brinda mayor fiabilidad, para la detección de la enfermedad. Según la normativa 740/99 de SENASA todos los productos porcinos destinados a consumo deben ser sometidos a dicha metodología.

Uno de los puntos a tener en cuenta para juzgar este resultado es el tamaño de las muestras analizadas. Según Nöckler (2000), la sensibilidad del método se ve afectada por la cantidad de tejido utilizado y el sitio del cual se extrajo la muestra. En el caso de nuestra investigación en primer lugar no siempre recibíamos muestras que nos permitieran extraer material suficiente, ya sea debido al tamaño de los animales a manejar como por las condiciones de almacenamiento y que a su vez no siempre se recibían los órganos recomendados para el análisis, que son diafragma, músculos intercostales, lengua o masetero.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Si bien el WB al ser un análisis de tipo inmunológico presenta mayor sensibilidad debería continuarse el estudio para contemplar si existe una diferencia empírica entre los positivos detectados por ambas técnicas. Cabe destacar que en este trabajo se utiliza por primera vez una técnica inmunológica indirecta para detectar *Trichinella* en roedores silvestres, y por lo tanto es posible que deban ajustarse algunos parámetros para hacer esta técnica más confiable y reproducible para el diagnóstico en los mismos. No existe mucha bibliografía al respecto del uso de esta técnica como método de detección inmunológico, más bien se ha probado con el Test de ELISA. De todas formas, este primer acercamiento y los hallazgos obtenidos alentaron a la presentación del tema como beca post doctoral de CONICET de la doctora Daniela Montes de Oca bajo el título “Desarrollo de un ELISA con antígenos de excreción/secreción para el diagnóstico de triquinosis en ratas silvestres asociadas a establecimientos ganaderos” (2019-2021).

Otro factor a tener en cuenta es el resultado del análisis estadístico del índice kappa. La fuerza de concordancia fue pobre y esto se debe a la diferencia entre lo detectado como positivo por ambas técnicas, dado que las mismas poseen sensibilidad diferente.

Aclaremos a su vez que en ambas técnicas se obtuvieron agrupaciones espaciales de casos positivos, lo cual nos indican tres zonas de riesgo en nuestra área de estudio. Cada zona posee un riesgo relativo asociado que nos indica el riesgo a ser positivo para Trichinellosis de un animal silvestre que se halla dentro del radio del cluster, siendo el cluster 1 de la ADE DAR el de mayor riesgo.

Por otra parte, en los casos donde se logró aislar larvas a través de la digestión, como fue mencionado anteriormente se realizó una genotipificación. Nuestro país tiene identificadas cuatro especies, *T. spiralis*, *T. patagoniensis*, *T. pseudospiralis* y *T. Britovi*, siendo *T. spiralis* la más comúnmente detectada en los casos de brotes humanos. Teniendo eso en cuenta, no es sorpresa que todos los casos detectados en nuestro estudio y que fueron sometidos a genotipificación y confirmados por secuenciación, resultaran positivas para *T. spiralis*.

En conclusión, en primer lugar, los resultados obtenidos fueron los esperados según nuestra hipótesis de que un análisis inmunológico tendría una diferencia significativa en relación con lo detectado mediante la digestión artificial. En todos los casos donde se realizó un aislamiento de larvas se identificó la presencia de *T. spiralis*.

En segundo lugar, a la baja cantidad de casos detectados positivos en el análisis por DAR (4 de 331) se le atribuyen las siguientes causas:

- Efectivamente no había presencia de larvas en las muestras recibidas que dieron resultados negativos a DAR, pero mediante el análisis inmunológico se determinó que el individuo estuvo en contacto con el parásito y por ende desarrolló anticuerpos.
- Las muestras analizadas no poseían en ciertos casos el peso adecuado para la realización de la muestra.
- El tipo de músculo analizado no era el ideal en todos los casos.

En tercer lugar, se sugiere la realización de planes de control sanitario en las áreas detectadas como riesgosas a través del análisis espacial.

Finalmente, se recomienda la realización de una ampliación en la investigación a fines de poder determinar, a correctas cantidades de muestra y origen muscular, si existe una diferencia significativa entre los resultados a través de ambas técnicas.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

### 3) Diferencias entre los tipos de establecimientos

Durante la realización de este trabajo se planteó la idea de que en establecimientos con mayor grado de tecnificación presentarían bajos porcentajes de casos positivos a *Trichinella sp.* en comparación con los establecimientos familiares o de baja escala productiva.

Esta idea surge del hecho de que se esperaría debido a la escala productiva, en los lugares de mayor tecnificación, que los controles de vectores de la enfermedad fueran más rigurosos y eficaces, mientras que en producciones a cielo abierto los animales en producción estuvieran en dinámico contacto con los mismos.

En relación con este último punto, muchos autores plantean que los cerdos criados al aire libre están más expuestos al contacto con la fauna silvestre, por lo que sería esperable un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad (Pozio y Murrell, 2006; Ribicich et al., 2009). Es un hecho que condiciones precarias de producción, donde no se controla la alimentación ni el ambiente en contacto con los animales aumenta las posibilidades de infección.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de casos positivos en ambos sistemas de producción de cerdos, por lo que se concluye que con los resultados obtenidos hasta el momento no podemos afirmar que en alguno de los sistemas de crianza haya mayor riesgo de infección con *Trichinella* para sus animales. De todas maneras, debido a que esto va en contra de nuestras hipótesis iniciales y lo expuesto en la bibliografía consultada, se podría plantear una continuación en la investigación ampliando el número de granjas muestreadas con ambos tipos de producción, con el objetivo de reafirmar o refutar los resultados obtenidos

Todos los resultados obtenidos en este y futuros trabajos tienen el propósito de contribuir al conocimiento de esta patología para poder brindar herramientas a todos los actores involucrados, que contribuyan al control de la enfermedad en nuestro país, evitando los casos humanos que provoca esta zoonosis.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S.F. et al. (1990). Basic local alignment search tool J. Mol. Biol. 215:403-410.

Backhans, A., y Fellström, C. (2012). Rodents on pig and chicken farms—a potential threat to human and animal health. Infection ecology & epidemiology, 2(1), 17093.

Balzarini M.G. et al. (2008). Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.

Betti, A. et al. (2014). Triquinellosis: conocimientos y hábitos en poblaciones epidemiológicamente diferentes de la Prov. de Buenos Aires, y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina .RAZ y EIE. 3 (9): 21-24.

Carletta, Jean. (1996). Assessing agreement on classification tasks: The kappa statistic. Computational Linguistics, 22(2), pp. 249–254.

Castaño Zubieta R. et al. (2004). First report of *Trichinella spiralis* from the white-eared (*Didelphis albiventris*) and the thick-tailed opossum (*Lutreolina crassicaudata*) in central Argentina. Helminthologia 51, 198-202.

Dupouy-Camet, J. y Bruschi, F. Management and Diagnosis of Human Trichinellosis. En: Dupouy-Camet, J. y Murrell, K.D., FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Paris, World Organisation for Animal Health, 2007, 37-61.

Foreyt, W. J. (2013). Trichinosis: Reston, Va., U.S. Geological Survey Circular 1388, 60 p., 2 appendixes.

Gamble, H.R. et al. Prevention of *Trichinella* infection in the domestic pig. En: Dupouy-Camet, J. y Murrell, K.D., FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Paris, World Organisation for Animal Health, 2007, 99-105.

Gómez Villafañe, I. E., et al. (2005). Guía de roedores de la provincia de Buenos Aires. LOLA, Buenos Aires, 100 págs

Krivokapich, S. et al. (2006). Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina. Journal of Helminthology, 80(3), 267-269

Krivokapich, S.J. et al. (2012). *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. J Parasitol.;42(10):903-10.

Krivokapich, S.J et al (2015) First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical región. Vet Parasitol., 208(3-4):268-71

Krivokapich, S. et al (2019). Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. Parasitology International 71: 53-55.

Leuckart, R. (1866). Studies on *Trichinella spirallis*, Leipzig, 1860, segunda edición- 1866.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Lovera, R., Fernández, M. S., y Cavia, R. (2015). Wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 202, 251-259.

Lovera, R. et al. (2017). Intrinsic and extrinsic factors related to pathogen infection in wild small mammals in intensive milk cattle and swine production systems. *PLoS neglected tropical diseases* 11 (6): e0005722

Montes de Oca, D. et al. (2018). Estudio preliminar de la presencia de *Trichinella spp.* en pequeños mamíferos silvestres en criaderos de cerdos intensivos y extensivos de la provincia de Buenos Aires. II Congreso Internacional de Zoonosis y IX Congreso Argentino de Zoonosis.

Montes de Oca, D. Pequeños mamíferos silvestres en sistemas de producción intensiva y extensiva de porcinos del centro de Argentina y su relación con las diferentes prácticas de manejo y la incidencia de *Trichinella spiralis* (Tesis de doctorado en el área de Ciencias Biológicas) Universidad de Buenos Aires (2019)

Nöckler K. et al. (2000). Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Vet Parasitol* 2000; 93: 335-350

Nöckler, K. y Kapel, C.M.O. Detection and Surveillance for *Trichinella*: meat inspection and hygiene, and legislation. En: Dupouy-Camet, J. y Murrell, K.D., *FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Paris, World Organisation for Animal Health, 2007, 69-91.

Pozio, E. (2001). New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary Parasitology*, 98: 133–148.

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

Pozio, E. Taxonomy, Biology and Epidemiology of *Trichinella* parasites. En: Dupouy-Camet, J. y Murrell, K.D., *FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Paris, World Organisation for Animal Health, 2007, 1- 30.

Pozio, E., Zarlenga, D. (2013). New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology*, 43: 983-997.

Ribicich, M. Trichinellosis. Estudio de la infección experimental en cerdos. Importancia económica y sanitaria del diagnóstico temprano (Tesis de Maestría en Salud Animal). Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA (1999).

Ribicich, M. (2005), Trichinellosis in Argentina: An historical review. *Veterinary Parasitology*, 132: 137–142.

Ribicich, M. et al (2009). Evaluation of the risk of transmission of *Trichinella* in pork production systems in Argentina. *Veterinary Parasitology*, 159: 350–353.

Riva, E. Trichinellosis: Aspectos múltiples de una zoonosis global. En: *FAO, Mejoramiento del control de la trichinellosis*. Roma, FAO, 2007, 94-103.

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

Ruiz, M. Trichinellosis: Técnica inmunoenzimática de diagnóstico (ELISA). En: FAO, Mejoramiento del control de la trichinellosis. Roma, FAO, 2007, 94-103.

Sambrook, J., Molecular cloning: a laboratory manual, Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Tercera edición, 2001, capítulo 5.

Stojcevic, D. et al (2004), The Epidemiological Investigation of *Trichinella* infections in Brown rats (*Rattus norvegicus*) and Domestic pigs in Croatia Suggest that Rats are not a Reservoir at the farm level. *International Journal for Parasitology*, 90 (3): 666-670.

Winter, M et al (2018). Trichinellosis surveillance in wildlife in northeastern Argentine Patagonia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 11, 32–35.

Yong Yang et al. (2016). Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans, *One Health*, 2, 25-30.

Zarlenga, D. et al (1999). A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non- encapsulated genotypes of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 29: 1859-1867.

Zenker, W.A. (1871). A la enseñanza de la enfermedad de trichina. *Archivo alemán de medicina clínica*, 8: 387-421.

[www.argentina.gob.ar/sites/default/files/alerta\\_brote\\_de\\_triquinosis\\_en\\_tres\\_provincias\\_de\\_argentina\\_27jul20181.pdf](http://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/alerta_brote_de_triquinosis_en_tres_provincias_de_argentina_27jul20181.pdf). Alerta de Brote de Triquinosis. Julio, 2018.

[www.argentina.gob.ar/senasa](http://www.argentina.gob.ar/senasa) SENASA. Agosto, 2018.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/135000-139999/135830/norma.htm> Resolución 1715/2007. Agosto, 2018

[www.bio-rad.com/es-ar/category/wet-tank-blotting-systems?ID=f49905e9-1a24-44df-8161-5021b70113a2](http://www.bio-rad.com/es-ar/category/wet-tank-blotting-systems?ID=f49905e9-1a24-44df-8161-5021b70113a2) BIORAD. Noviembre, 2018.

[www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletinesepidemiologicos](http://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletinesepidemiologicos) Boletín Epidemiológico. Diciembre, 2018.

[www.inta.gob.ar/servicios/secuenciacion-de-acidos-nucleicos-adn-por-electroforesis-capilar](http://www.inta.gob.ar/servicios/secuenciacion-de-acidos-nucleicos-adn-por-electroforesis-capilar) Unidad de genómica del INTA Castelar, Servicio de secuenciación de ácidos nucleicos por electroforesis capilar. Diciembre, 2018.

[www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-14346-153011](http://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/ley-14346-153011) Ley 14346. Enero, 2019

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

## ANEXO

A continuación, se encuentra la planilla donde se especifica para cada muestra:

- Establecimiento
- Tipo de establecimiento
- Año de la toma de muestra
- Especie
- Resultado a DAR
- Resultado a WB

REFERENCIAS	
1	POSITIVO
0	NEGATIVO
SA	SIN ANALIZAR
Los establecimientos se encuentran numerados por pedido de los realizadores del muestreo.	

Establecimiento	Tipo de establecimiento	Año	SP	DAR
36	Tambo	2010	<i>Rattus rattus</i>	1
36	Tambo	2010	<i>Mus musculus</i>	SA
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	1
21	Refugio para perros	2018	<i>Rattus norvergicus</i>	0
22	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvergicus</i>	0
24	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus rattus</i>	0
24	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvergicus</i>	0
25	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Rattus rattus</i>	1
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Didelphis albiventris</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
28	Criadero tipo industrial	2010	<i>Mus musculus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	1
31	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2011	<i>Mus musculus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Mus musculus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Didelphis albiventris</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2015	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Akodon azarae</i>	0
31	Criadero tipo industrial	2018	<i>Akodon azarae</i>	0





Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

37	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
37	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
37	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
38	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2017	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2017	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2017	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2017	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus rattus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus rattus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus rattus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
39	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Akodon azarae</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus rattus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
48	Criadero tipo industrial	2015	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	0



Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

27	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
27	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
27	Criadero tipo familiar	2015	<i>Mus musculus</i>	0
27	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	SA
27	Criadero tipo familiar	2015	<i>Mus musculus</i>	SA
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
29	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
30	Criadero tipo familiar	2015	<i>Didelphis albiventris</i>	0
30	Criadero tipo familiar	2015	<i>Didelphis albiventris</i>	0
33	Criadero tipo industrial	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
34	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
40	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
40	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
40	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
40	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
40	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
41	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
42	Criadero tipo industrial	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
43	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
44	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
45	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
45	Criadero tipo familiar	2016	<i>Mus musculus</i>	0
45	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
45	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
45	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
46	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
46	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
46	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
46	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
46	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2010	<i>Mus musculus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2010	<i>Mus musculus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2010	<i>Mus musculus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2011	<i>Rattus norvegicus</i>	1
47	Criadero tipo familiar	2011	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0

Estudio de la presencia de *Trichinella sp.* en roedores capturados en los alrededores de criaderos de cerdos en la provincia de Buenos Aires

47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2016	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2018	<i>Rattus norvegicus</i>	0
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	SA
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus norvegicus</i>	SA
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus rattus</i>	SA
47	Criadero tipo familiar	2015	<i>Rattus rattus</i>	SA
47	Criadero tipo familiar	2010	<i>Rattus norvegicus</i>	1