

COMPARACION DEL INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA CON LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA *Trichinella spiralis* EN RATONES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE ^a

Federico Martínez Gómez ^b
Carlos Ramón Bautista Garfias ^{b,c}
Olga Ixta Rodríguez ^b
Blanca Rosa Aguilar Figueroa ^b
Sara Soria Cortés ^b
Argelia Idalia Cortés Cervantes ^b

RESUMEN

Martínez G F, Bautista G C R, Ixtla R O, Aguilar F B R, Soria C S, Cortés C A I. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 3 1998 pp 179-186. Treinta ratones NIH, fueron inoculados por vía oral con 250 larvas infectivas de *Trichinella spiralis*/animal. Se obtuvieron muestras de los sueros para determinar los títulos de anticuerpos contra antígenos somático (S) y de excreción/secreción (E/S) de larvas de *T. spiralis* utilizando las técnicas de Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD) y de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Los animales infectados con *T. spiralis* presentaron títulos de anticuerpos contra antígenos E/S que oscilaron entre 5 y 11 Log₂. En este grupo, se observó que 26 de 30 ratones (86.6 %), mostraron títulos superiores a todos los testigos; mientras que los títulos más altos observados en dos de 30 ratones no infectados (6.6%) y en tres de 10 infectados con oxiuroideos e *Hymenolepis sp* (15%) fueron de 3 y 7 Log₂, respectivamente. Mediante ICD se detectó un alto grado de reactividad cruzada contra antígenos S de *T. spiralis* en los sueros de animales parasitados con otros helmintos. Solamente dos de 30 ratones con *T. spiralis* (6.6%) mostraron títulos más altos (> 9 Log₂) que los del grupo con otros helmintos. Cuando se compararon los títulos de anticuerpos de los sueros de animales infectados con *T. spiralis* (n=30) con los de los no infectados (n=30), la sensibilidad para ICD con E/S (umbral de positividad 5 Log₂), ICD con S (umbral de positividad 6 Log₂) e IFI (umbral de positividad 4 Log₂) fue de 100%. Cuando se evaluaron los sueros de animales triquinelosos (n=30) y los de ratones con otros parásitos (n=10) la sensibilidad para ICD, con E/S (umbral de positividad 8 Log₂), fue del 86.6% y la especificidad del 100 %. De acuerdo a los resultados se concluye que el ICD, por su bajo costo y facilidad de ejecución, es una técnica adecuada para la detección de anticuerpos específicos en triquinelosis murina.

PALABRAS CLAVE: Inmunoensayo en Capa Delgada, Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta, *Trichinella spiralis*, Ratones.

INTRODUCCION

La infección por *Trichinella spiralis* (triquinelosis) en el hombre se encuentra distribuida discretamente en México, pues

el consumo de carne de cerdo es común, las condiciones de crianza de éste animal son deficientes -cerdos de traspatio- y la matanza clandestina ocurre con mucha frecuencia (1, 2, 3). Además es posible que exista la transmisión al ser humano por la ingesta de otras especies de mamíferos. Desde finales del siglo pasado se han registrado observaciones de que los cerdos alimentados con desechos alimenticios presentan una mayor incidencia de triquinelosis que aquellos alimentados con granos o pastura (4). La

^a Recibido el 26 de agosto de 1998 y aceptado para su publicación el 3 de diciembre de 1998

^b Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, México, D.F., C.P. 11340.

^c Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, INIFAP-SAGAR. Km. 11.5 Carretera federal Cuernavaca-Cuahtla, Col. Progreso, Jiutepec, Morelos. C.P. 62550.

Para solicitud de separatas dirigirse al segundo autor.

transmisión cerdo-cerdo ha sido plenamente demostrada (5) y por el contrario, la transmisión de ratas al cerdo ha sido objeto de informes contradictorios, aunque no se descarta como mecanismo de conexión entre el ciclo silvestre y el doméstico (6, 7, 8).

La información existente, indica que el cerdo es la fuente principal de infección para el hombre, y por lo tanto, es imperioso desarrollar medidas encaminadas a la prevención de ésta enfermedad. En este contexto, se plantea la necesidad de diagnosticar oportunamente la infección en el cerdo y para ello se pueden aplicar métodos de diagnóstico ante y posmortem.

La técnica que más se utiliza para el diagnóstico en la mayoría de los rastros de nuestro país, en el mejor de los casos, es el método parasitoscópico llamado comúnmente triquinoscopía la que presenta una deficiencia considerable en cuanto a sensibilidad (detecta tres larvas por gramo de tejido muscular) permitiendo, por lo tanto, que algunos cerdos con infecciones ligeras pasen como animales sanos (9). Esta situación obviamente representa riesgo para la salud en los individuos consumidores de los productos cárnicos que se obtienen de estos animales.

En nuestro país, con frecuencia, se practica la matanza clandestina de cerdos, los cuales se crían sin control sanitario alguno, lo que representa el mayor riesgo para la salud de los consumidores (2, 3). Es indispensable, por lo tanto, realizar estudios de campo que permitan conocer la prevalencia de infección en cerdos de traspatio, para que de ser posible se prevenga la transmisión al hombre. Para ello es necesario contar con técnicas de

diagnóstico aceptables en cuanto a su sensibilidad, especificidad, bajo costo y facilidad de realización en laboratorios rudimentarios.

El Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD) (10) cumple con los requisitos anteriores, por lo que en el presente trabajo se evaluó, en comparación con la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como técnica de referencia, para la detección de anticuerpos específicos contra *Trichinella spiralis* en ratones infectados experimentalmente con este nematodo.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 30 ratones hembra de la cepa NIH, con un peso promedio de 25g, libres de parásitos. Adicionalmente se usaron 10 ratones infectados naturalmente con *Syphacea sp* e *Hymenolepis sp*.

Parásito:

Se utilizó la cepa de *Trichinella spiralis* del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, la cual se mantiene por pases en ratas de la cepa Wistar, mediante la ingesta de carne infectada.

Antígenos

Antígeno somático (S):

Las larvas de *Trichinella spiralis* obtenidas mediante digestión artificial, se maceraron en un homogeneizador de cristal (Ten broeck), a una temperatura de 4 C, adicionando inhibidores de proteasas (TPCK y PMSF), en buffer de fosfatos pH 7.2. El extracto obtenido se centrifugó a 2000 x g durante 30 min. El sobrenadante se colectó, distribuyó en alícuotas y se congeló -20 C hasta su uso.

Antígeno de Excreciones/Secreciones (E/S):

Las larvas vivas, obtenidas por digestión artificial, se mantuvieron por 48 horas en medio de Rohrbacher (11) adicionado de antibióticos (Penicilina, 100UI-Estreptomocina, 100 μ g/ml) y antifúngicos, bajo una atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Después de este tiempo el medio fue centrifugado a 2000 xg/15 min, posteriormente se colectó el sobrenadante al que se añadieron inhibidores de proteasas, se distribuyó en alícuotas y se conservó a -20 C hasta su uso.

En ambos antígenos se determinó la cantidad de proteínas mediante el método de Lowry *et al* (12) y se ajustó a una concentración de 180 μ g/ml.

Inoculación de animales de experimentación y obtención de sueros:

Los 30 ratones fueron inoculados por vía oral con 250 larvas infectivas (L1) de *Trichinella spiralis*/animal. Se colectó sangre de todos los animales para obtener suero antes de la infección y 30 días después de ésta; los sueros fueron distribuidos en alícuotas que a su vez se almacenaron a -20 C hasta su uso.

Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD):

Se llevó a cabo de acuerdo a Morilla *et al.*, (13). Cajas de Petri de plástico "nuevas" de 8.5 cm de diámetro se lavaron con 10 ml de etanol al 70%, se secaron al aire y se sensibilizaron con una solución de antígeno somático o de excreción-secreción a una concentración de 180 μ g/ml. Luego se incubaron en cámara húmeda a 37 C durante 30 min para, posteriormente eliminar el antígeno, lavar tres veces con agua destilada y secar con

un ventilador. A continuación se adicionaron 10 μ l de cada dilución del suero a probar sobre la superficie de las cajas y se incubó en cámara húmeda a 37 C por 60 min. Luego, las cajas se invirtieron para exponer dicha superficie por 60 segundos a vapor de agua a 60 C, se lavó tres veces con agua destilada y se secó con un ventilador. Finalmente, se volvió a exponer la superficie, de 45 a 120 segundos a vapor de agua a 60 C, al término de los cuales se llevó a cabo la lectura. Se consideró como reacción positiva aquel sitio de aplicación del suero en donde se observaron gotas grandes de condensación de agua. Como reacción negativa se consideró aquel sitio de aplicación del suero en donde las gotas condensadas eran pequeñas, similares a las de las áreas en donde no se aplicó suero.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

Se efectuó de acuerdo a Sadun *et al.*, (14). Se fijaron larvas de *Trichinella spiralis* con una mezcla de ácido acético- etanol V/V. Sobre la preparación antigénica, se adicionaron las diluciones de la muestra de suero a probar y se incubó a 37 C durante 30 minutos en cámara húmeda, se lavó con PBS pH 7.2 en tres ocasiones durante 5 minutos; posteriormente se adicionó anti gamma globulina marcada con fluoresceína, diluida 1: 30, se lavó con PBS pH 7.2 en tres ocasiones durante 5 minutos; se adicionó Azul de Evans diluido 1: 200 y se incubó a 37 C durante 5 minutos en cámara húmeda; finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Determinación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas

Estos parámetros se evaluaron de acuerdo con Palmer y Cavallaro (15)

RESULTADOS

La distribución de los títulos de anticuerpos (Log_2) anti-*T. spiralis* por medio de ICD e IFI en los sueros de los ratones normales, infectados con *T. spiralis* o con otros parásitos se presenta en la Figura 1. Los títulos de anticuerpos mínimo y máximo para ICD con antígeno E/S para los sueros de animales normales, infectados con *T. spiralis* e infectados con otros helmintos fueron de 0-3, 5-11 y 4-12, respectivamente; mientras que estos valores para los mismos grupos de animales con ICD pero con antígeno S fueron de 0-4, 6-12 y de 6-9, respectivamente. Cuando se utilizó IFI con larvas completas como antígeno, se obtuvieron valores de 0-1 y 4-12 para los sueros de ratones normales y de animales infectados con *T. spiralis*, respectivamente (Figura 1). Para el caso de ICD con E/S, en los sueros de animales normales, infectados con *T. spiralis* e infectados con otros helmintos, se obtuvieron títulos promedio (\pm D.E.) de 2.2 ± 0.8 ; 8.9 ± 0.5 y de 5.4 ± 1.3 , respectivamente (Cuadro 1).

Para ICD con S, en los sueros de animales normales, infectados con *T. spiralis* e infectados con otros helmintos, se obtuvieron títulos promedio de 3.5 ± 0.5 ; 8.6 ± 1.0 y de 8.2 ± 1.0 , respectivamente (Cuadro 1).

Para el caso de IFI, en los sueros de animales normales y en los de ratones infectados con *T. spiralis* se observaron títulos promedio de 0.7 ± 0.5 y de 7.3 ± 1.9 , respectivamente (Cuadro 1). No se dispuso de la cantidad suficiente de sueros de animales infectados con otros parásitos

para determinar los títulos de anticuerpos con esta prueba.

Al comparar el promedio de los títulos de anticuerpos anti-*T. spiralis*, obtenidos por medio de ICD con antígeno E/S, se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los sueros de ratones triquinelosos y los de animales no parasitados, así como con los de ratones parasitados con otros helmintos. Cuando el procedimiento anterior se llevó a cabo por medio de ICD con antígeno S, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) cuando se compararon los promedios del título de anticuerpos entre animales triquinelosos y ratones no infectados; sin embargo, no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) entre el promedio del título de anticuerpos de los sueros de los animales con *T. spiralis* y los de los ratones parasitados con otros helmintos (Cuadro 1).

Cuando se compararon los títulos de anticuerpos de los sueros de animales infectados con *T. spiralis* con los de los no infectados, la sensibilidad para ICD con E/S (umbral de positividad 5 Log_2), ICD con S (umbral de positividad 6 Log_2) e IFI (umbral de positividad 4 Log_2) fue de 100% (Cuadro 2). Cuando se evaluaron los sueros de animales triquinelosos y los de ratones con otros parásitos la sensibilidad para ICD, con E/S (umbral de positividad $> 7 \text{ Log}_2$), fue del 86.6% y la especificidad del 100%; sin embargo, con el antígeno S, usando el mismo umbral de positividad, se obtuvo una sensibilidad del 93.3% y una especificidad del 20% (datos no mostrados).

Cuadro 1. Promedio \pm D.E. de los títulos de anticuerpos (Log_2) contra *Trichinella Spiralis*, determinados por Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en sueros de ratones infectados con *T. Spiralis*, no infectados e infectados con otros helmintos ^a

Prueba	Antígeno	Suero de ratones:				Valor p	
		Infectados con <i>T. spiralis</i> (n=30)	No infectados (n=30)	Infectados con otros helmintos (n=10)	No Infectados	Infectados con otros helmintos	
ICD	E/S	8.9 \pm 0.5	2.2 \pm 0.8	5.4 \pm 1.3	< 0.05	< 0.05	
ICD	S	8.6 \pm 1.0	3.5 \pm 0.5	8.2 \pm 1.0	< 0.05	> 0.05	
IFI	LC	7.3 \pm 1.9	0.7 \pm 0.5	ND	< 0.05	ND	

^a *Syphacea sp* e *Hymenolepis sp.*

E/S: Antígeno de excreciones/secreciones de larvas infectivas de *T. spiralis*; S: Antígeno somático de larvas infectivas de *T. spiralis*; LC: Larvas infectivas completas de *T. spiralis*.

ND: No determinado.

Cuadro 2. Numero de ratones que mostraron anticuerpos contra *Trichinella Spiralis* por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD) y sensibilidad de las pruebas.

Presencia de <i>T. spiralis</i>	+			-		
	30			30		
Antígeno:	E/S	S	LC	E/S	S	LC
Serología positiva por medio de:						
FI ^a	ND	ND	30	ND	ND	0
CD ^b	30	30	ND	0	0	ND
Porcentaje de sensibilidad ^c :						
IFI	ND	ND	100			
ICD	100	100	ND			

E/S: Antígeno de excreciones/secreciones de larvas infectivas de *T. spiralis*.

S: Antígeno somático de larvas infectivas de *T. spiralis*.

LC: Larvas infectivas completas de *T. spiralis*

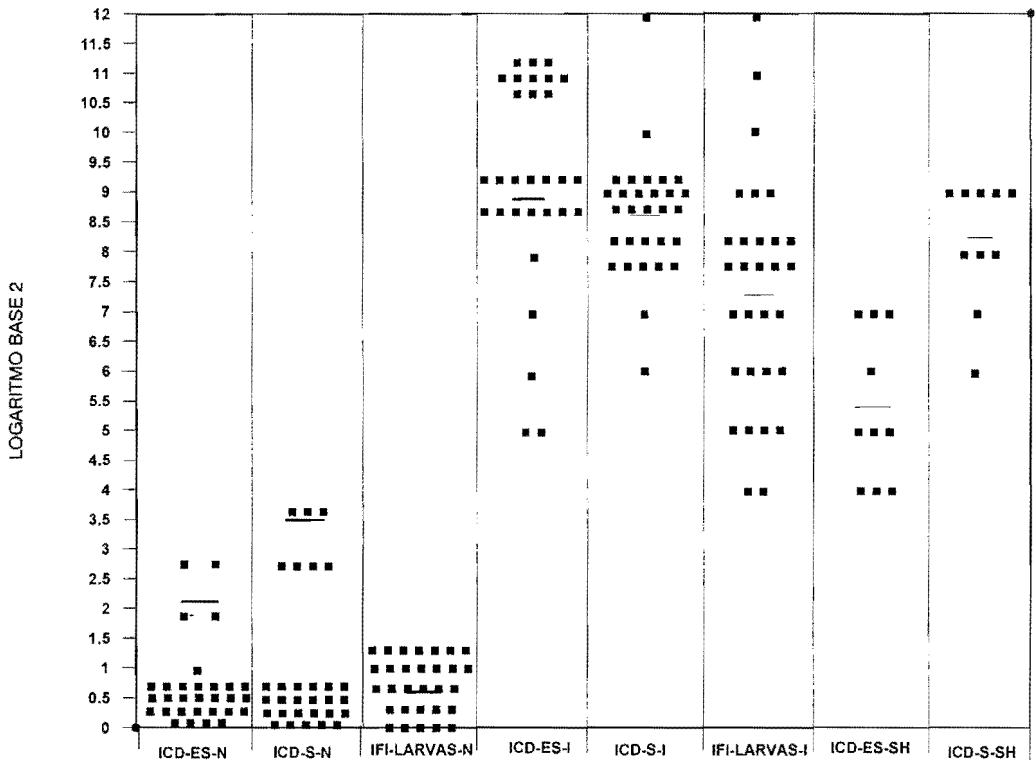
ND: No determinada

^a Se consideró como positivo un suero con un título $\geq 4 \text{ Log}_2$

^b Se consideró como positivo un suero con un título $\geq 5 \text{ Log}_2$ con E/S y $\geq 6 \text{ Log}_2$ con S

^c % de sensibilidad = $\frac{\text{No. de ratones infectados con } T. spiralis \text{ positivos a la prueba}}{\text{No. total de ratones infectados con } T. Spiralis} \times 100$

FIGURA 1. Distribución de títulos de anticuerpos anti-*Trichinella spiralis* en sueros de ratones normales (N), infectados con *T. spiralis* (I) e infectados con otros helmintos (SH) por medio de Inmunoensayo en Capa Delgada (ICD) con Antígeno de Excreciones/Secreciones (ES) y Somático (S) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con larvas.*



* Cada punto representa un animal; la línea horizontal representa el título promedio de anticuerpos.

DISCUSION

En el caso del antígeno somático de *T. spiralis*, se observó un mayor grado de reactividad inespecífica con los sueros de los ratones del grupo testigo infectado con otros parásitos. En el 23.3 % de los animales no infectados se observaron títulos hasta de 4 Log₂, sin embargo, los ratones infectados con otros helmintos presentaron títulos hasta de 9 Log₂, por lo

que la línea de corte tendría que ser superior a este título de anticuerpos y, por lo tanto, una prueba auténticamente positiva sería a partir de 10 Log₂, pero la sensibilidad de la prueba se reduciría considerablemente; por lo que, bajo estas condiciones, no es recomendable la utilización de antígenos somáticos crudos para el diagnóstico de la triquinelosis en animales.

La prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando como antígeno a la larva infectiva de *T. spiralis* (L1), tuvo una sensibilidad de 100 % y la especificidad respecto a los animales no infectados fue también del 100 %; sin embargo, no se evaluó con sueros de animales infectados con otros helmintos.

Dentro de las técnicas serológicas que más se emplean en el diagnóstico de esta infección se encuentra el inmunoensayo enzimático (ELISA) el cual, es altamente sensible y cuya especificidad depende también de la calidad del antígeno empleado como lo demostraron Arríaga *et al.* (16) quienes obtuvieron con esta técnica alta sensibilidad y especificidad cuando utilizaron un antígeno purificado con anticuerpos monoclonales, proveniente de superficie/estocoma de larvas de *T. spiralis*. Por otro lado, los antígenos de excreción/secreción también han resultado altamente eficientes en esta técnica (17). En estos antígenos se encuentran epitopos inmunodominantes, reconocidos por una amplia variedad de huéspedes, sobresaliendo el carbohidrato tivelosa, el cual, es un candidato excelente para mejorar la especificidad de las pruebas diagnósticas ya que solamente se ha localizado en *Trichinella spiralis* y no en otros parásitos helmintos; sin embargo, la tivelosa se encuentra en la pared de bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* las cuales, se localizan frecuentemente en cerdos y en el hombre, lo que plantea su posible pérdida de valor para el diagnóstico específico (17). Por lo tanto, mientras no se produzcan antígenos altamente específicos que puedan utilizarse en técnicas sencillas, relativamente económicas, y que puedan

llevarse a cabo en laboratorios con escasa infraestructura, como es el caso de muchos laboratorios en México, se puede recomendar el uso de técnicas como el ICD, el cual con antígenos apropiados, como los de excreción/secreción, funciona adecuadamente, por lo que se sugiere su evaluación en encuestas epidemiológicas, principalmente en el diagnóstico de triquinosis de cerdos de traspatio en su lugar de origen, para detectar oportunamente zonas endémicas y establecer medidas de prevención de la enfermedad en el hombre.

COMPARISON OF THIN LAYER IMMUNOSSAY WITH INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE TEST TO DETECT ANTIBODIES AGAINST *Trichinella spiralis* IN EXPERIMENTALLY INFECTED MICE.

SUMMARY

Martínez G F, Bautista G C R, Ixtla R O, Aguilar F B R, Soria C S, Cortés C A I. *Téc. Pec. Méx.* Vol 36 No 3 1998 pp 179-186. Thirty NIH mice were orally inoculated with 250 *Trichinella spiralis* infective larvae/animal. Serum samples were obtained to determinate antibody titers against somatic (S) and excretion/secretion (E/S) antigens *T. spiralis* larvae. Thin Layer Immunoassay (TIA) and Indirect Immunofluorescent Test (IFT). *T. spiralis*-infected animals, showed antibody titers against E/S antigens which oscillated from 8 to 11 Log₂. In these group, 26 out of 30 mice (86.6 %) showed titers above all controls; whereas the highest titers observed in two out of 30 uninfected mice (6.6%) and in three out of 10 infected with oxyurid nematodes and *Hymenolepis sp* (15%) were of 3 and 7 Log₂, respectively. By using TIA it was detected a high degree of cross reactivity to *T. spiralis* S antigens in sera from animals parasitized with other helminths. Only two out of 30 mice infected with *T. spiralis* (6.6%) showed higher titres (> 9 Log₂) than those observed in animals parasitized with other helminths. When antibody titers from *T. spiralis*-infected mice and from uninfected animals were compared, the sensitivity for TIA with E/S antigen (positivity threshold 5 Log₂), TIA with S antigen (positivity threshold 6 Log₂) and IFT (positivity threshold 4 Log₂) was of 100%. When sera from *T. spiralis* infected animals (n=30) and those from mice

infected with other parasites (n=10), the sensitivity for TIA with E/S antigen (positivity threshold 8 Log₂) was of 86.6% and the specificity was of 100%. According with the results it is concluded that TIA, due to its low cost and simplicity is an appropriate technique for detection of specific antibodies in murine trichinellosis.

KEY WORDS: Thin layer immunoassay, Indirect Immunofluorescent Test, Antibodies to *Trichinella spiralis*, Mice.

REFERENCIAS

- Murrell KD, Lieby DA, Fuffy C, Shad GA. Susceptibility of domestic swine to wild animal isolates of *Trichinella spiralis*. In: Kim, editor. Proceedings of the 6th International Conference on Trichinellosis. Albany: State University of New York Press, 1985: 301.
- Ramírez-Valenzuela M. La triquinelosis en México, un estudio epidemiológico retrospectivo. En: Morilla A, Correa P, Stephano A (eds.) Avances en enfermedades del cerdo. Asociación Mexicana de Especialistas en Cerdos, México, D.F. 1985:557-586.
- Martínez-Marañón R. ¿ Está aumentando la triquinosis en México? ¿ Podría esto ser una consecuencia inesperada de nuestro desarrollo? Sal. Pub. Méx. 1985, 27:40.
- Martínez-Marañón R. Triquinelosis humana. En: Memorias del Curso de Actualización en Zoonosis Parasitarias, U.N.A.M., México, D.F. 1986:434-441.
- Hanbury R D, Doby P B, Miller H O, Murrell K D. Trichinosis in a herd of swine: cannibalism as a major mode of transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1986; 188:1155.
- Campbell W C. Epidemiology I. Modes of transmission. In: Campbell W C, editor. *Trichinella* and Trichinosis. New York: Plenum Press, 1983: 425-444.
- Murrell K D, Gamble H R, Schad G A. Experimental transmission of *Trichinella spiralis* to swine by infected rats. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 1984; 51:66.
- Leiby D A, Duffy C H, Murrell K D, Schad G A. *Trichinella spiralis* in an agricultural ecosystem: transmission in the rat population. J. Parasitol.. 1990; 76:360.
- Ruitenbergh E J, Van Knapen F, Elgersma A. Surveillance in swine by immunodiagnostic methods. In: Campbell, W C, editor. *Trichinella* and Trichinosis. New York: Plenum Press, 1983: 529-550.
- Elwing H, Nilsson L A, Ouchterlony. Visualization principles in thin-layer immunoassays (TIA) on plastic surfaces. J. Immunol. Methods, 1977; 17:131.
- Rohrbacher G H. Observations on the survival *in vitro* of bacteria-free adult common liver flukes, *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 1957; 43:9.
- Lowry O H, Rosebroug N J, Lewis F A, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 139:165.
- Morilla G A, Arriaga de Morilla C, Gómez A. Evaluación preliminar de la prueba de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico serológico de la fasciolosis en animales. Vet. Méx., 1979; 10:181.
- Sadun E, Anderson R, Williams J. Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of trichinosis. Exp. Parasitol. 1962; 12:423.
- Palmer D F, Cavallaro J J. Some concepts of quality control in immunoserology. In: Rose R, Friedman H, editors. Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1980: 1078-1082.
- Arriaga C, Muñiz E, Morilla A, Ortega-Pierres M G. *Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp Parasitol., 1989; 69: 363.
- Yépez-Muliá L, Ortega-Pierres M G. Aspectos actuales sobre el diagnóstico de la triquinelosis. Rev Lat-Amer Microbiol 1994, 36: 127.